

# **Tissue Engineering eines dreidimensionalen Herzgewebes unter Einsatz von Mesenchymalen Stammzellen und histologische Untersuchung des Gewebes auf Integration und Zelldifferenzierung in einem In-vivo-Rattenmodel**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Dr. med.**

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von: Cathleen Spath

Geburtsdatum, Geburtsort: 06.12.1985, Bad Frankenhausen

Angefertigt am: Herzzentrum Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Stefan Dhein

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 17.11.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Bibliografische Beschreibung</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>vi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Hintergrund . . . . .	1
1.2 Alternative Zellsorten für kardiales Tissue Engineering . . . . .	2
1.3 Charakterisierung der MSCs . . . . .	4
1.4 Plastizität der MSCs . . . . .	5
1.5 Einsatz von MSCs in der kardialen regenerativen Medizin . . . . .	5
1.6 Duale Rolle der MSCs in der Tumorentwicklung . . . . .	6
1.7 Fragestellungen und Ziele . . . . .	8
<b>2 Materialien</b>	<b>9</b>
2.1 Geräte und Hilfsmittel . . . . .	9
2.2 Laborutensilien . . . . .	12
2.3 Chemikalien und Biochemikalien . . . . .	14
2.4 Medikamente und Chemikalien für Tierexperimente . . . . .	16
2.5 Versuchstiere . . . . .	17
2.6 Zellen . . . . .	17
2.6.1 Herstellerangaben: cMSCs . . . . .	17
2.7 Chemikalien für Histologie . . . . .	17
2.8 Primärantikörper . . . . .	19
2.9 Sekundärantikörper . . . . .	20
2.10 Markierte Antikörper für FACS . . . . .	20
2.11 Zusammensetzung der Medien . . . . .	21
2.12 Allgemeine Lösungen . . . . .	22
2.13 Lösungen für Histologie . . . . .	22
<b>3 Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Verwendete MSC-Linien . . . . .	24
3.1.1 Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus adultem Knochenmark der Ratte (sMSC) . . . . .	24
3.1.1.1 Anästhesie der Ratten . . . . .	24
3.1.1.2 Isolation und Kultivierung der sMSCs . . . . .	24
3.1.2 Auftauen und Kultivierung der cMSCs . . . . .	25
3.2 Subkultivierung der beiden MSC-Linien . . . . .	25
3.3 Charakterisierung der MSCs . . . . .	25
3.3.1 Durchflusszytometrische Messungen der MSCs . . . . .	25
3.3.1.1 Vorbereitung der Proben . . . . .	26
3.3.1.2 Messung der Proben am Durchflusszytometer . . . . .	26

3.3.2	Adipozytendifferenzierung der MSCs . . . . .	27
3.3.2.1	Oil-Red-0-Färbung der Adipozyten . . . . .	28
3.4	EHTs aus neonatalen Kardiomyozyten und mesenchymalen Stammzellen . .	28
3.4.1	Isolation von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte . . . . .	28
3.4.1.1	Herstellung und Kultivierung eines EHTs mit neonatalen Kardiomyozyten . . . . .	29
3.4.2	Herstellung und Kultivierung von Engineered Tissues mit sMSCs und cMSCs . . . . .	30
3.4.3	Elektrostimulation der kultivierten EHTs und MSC-ETs . . . . .	30
3.4.4	Implantation der EHTs und MSC-ETs . . . . .	32
3.5	Histologie . . . . .	34
3.5.1	Fixierung, Einbettung und Schneiden der EHTs und MSC-ETs . . .	34
3.5.2	Hämalaun-Eosin-Färbung . . . . .	34
3.5.3	Modifizierte Elastika van Gieson Färbung . . . . .	35
3.5.4	Azan-novum-Färbung nach Geidies . . . . .	35
3.5.5	Immunfärbungen . . . . .	36
3.5.5.1	Vorbehandlung . . . . .	36
3.5.5.2	Von-Willebrand-Faktor . . . . .	36
3.5.5.3	Cx43, Troponin I und DAPI . . . . .	37
3.5.5.4	CD90 und DAPI von Paraffinschnitten . . . . .	37
3.5.5.5	CD90 und DAPI von MSC-Zellkultur . . . . .	38
3.5.5.6	DAPI mit jeweils Cx40, Cx43 oder Cx45 . . . . .	38
3.5.5.7	Ki-67 und DAPI mit jeweils Cx40, Cx43 oder Cx45 . . . .	39
3.5.5.8	CD3, CD20 und CD45 . . . . .	40
3.5.6	Auswertung der Histologie . . . . .	40
3.6	Textverarbeitung und statistische Auswertung . . . . .	40
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
4.1	Charakterisierung der MSCs . . . . .	41
4.1.1	Morphologische Analyse und Proliferation der MSCs im Vergleich . .	41
4.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der MSCs . . . . .	41
4.1.3	Adipozytendifferenzierungsrate der MSCs . . . . .	41
4.2	Vergleich der EHTs und MSC-ETs in vitro und in vivo . . . . .	44
4.2.1	Übersicht zu hergestellten EHTs und MSC-ETs . . . . .	44
4.2.2	Morphologie und Funktion . . . . .	44
4.2.3	Statistischer Vergleich . . . . .	44
4.2.3.1	Anteil an Kollagen und Myozyten . . . . .	46
4.2.3.2	Expression von Troponin I und Cx43 . . . . .	49
4.2.3.3	Ausbildung von elastischen Fasern . . . . .	51
4.2.3.4	Ausbildung von Gefäßen . . . . .	53
4.2.3.5	CD90-Expression in sMSC-ETs und cMSC-ETs . . . . .	60
4.3	Entwicklung eines Tumors nach cMSC-ET-Transplantation . . . . .	61
4.3.1	Makroskopisch morphologische Beschreibung des Tumors . . . . .	61
4.3.2	Pathologische Beschreibung des Tumors . . . . .	61
4.3.3	Qualitative Expression von CD3, CD20 und CD45 . . . . .	64
4.3.4	Grading des Weichteilsarkoms . . . . .	65
4.3.5	Qualitative Expression von CD90 . . . . .	66
4.3.6	Verteilung der kardialen Connexine . . . . .	66
4.3.6.1	Ki-67- und Connexin-Co-Expression . . . . .	68

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>5 Diskussion</b>	<b>71</b>
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>82</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>Anlagen</b>	<b>99</b>
<b>Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>102</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>
<b>Publikationen</b>	<b>104</b>
<b>Danksagung</b>	<b>106</b>

# Bibliografische Beschreibung

Spath, Cathleen

**Tissue Engineering eines dreidimensionalen Herzgewebes unter Einsatz von Mesenchymalen Stammzellen und histologische Untersuchung des Gewebes auf Integration und Zelldifferenzierung in einem In-vivo-Rattenmodell**

Universität Leipzig, Dissertation

113 Seiten, 181 Literaturangaben, 59 Abbildungen, 17 Tabellen, 3 Anlagen

Am Herzzentrum Leipzig konnte bereits unter Einsatz von neonatalen Kardiomyozyten ein dreidimensionales vaskularisiertes Engineered Heart Tissue (EHT) etabliert und in Ratten mit dilatativer Kardiomyopathie implantiert werden. In Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz zur Behandlung von fortgeschrittenen kardialen Erkrankungen ist es notwendig die neonatalen Kardiomyozyten der etablierten EHTs durch eine alternative Zellsorte zu ersetzen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark der Ratte verwendet, da sie autolog aus fast jedem Körpergewebe gewonnen werden können und somit ethisch und immunologisch unbedenklich sind. Es ist gelungen formstabile, transplantationsfähige Engineered Tissues sowohl aus selbst isolierten MSCs (sMSC-ET) als auch aus kommerziell erworbenen MSCs (cMSC-ET) herzustellen. Bereits in vitro hatten sich in den künstlich hergestellten sMSC-ETs und cMSC-ETs Mikrogefäße entwickelt. Nach Implantation der MSC-ETs um ein Rattenherz verbesserte sich deren Vaskularisierung signifikant. Zusätzlich konnte in vivo eine De-novo-Synthese von elastischen Fasern als Zeichen eines Anpassungsprozesses nachgewiesen werden. Das Hauptziel dieser Arbeit, nämlich die kardiale Differenzierung der MSCs, wurde jedoch verfehlt. Entsprechend diesem Ergebnis steht bis heute ein endgültiger Beweis aus, ob MSCs fähig sind sich in funktionelle echte Kardiomyozyten zu differenzieren.

Überdies entwickelte sich aus einem der drei implantierten cMSC-ETs ein hochmalignes undifferenziertes pleomorphes Sarkom, welches infiltrierend in das Rattenherz einwuchs. Diese Beobachtung wurde nicht für sMSC-ETs gemacht. Bei der histologischen Analyse des pleomorphen Sarkoms zeigte sich, dass dieses keine gewebespezifischen Connexine an Stellen des invasiven Wachstums exprimierte und nahezu keine am Übergang vom Tumor zum Herzgewebe. Gleichwohl bestand zwischen proliferativer Aktivität und Connexin-Expression eine negative Korrelation. Diese Beobachtungen unterstützen zwei bekannte Theorien. Zum einen könnte das invasive Wachstum von Tumoren durch eine gestörte bzw. fehlende Kommunikation von Gap-Junction-Kanälen zwischen Tumor- und gesunden Gewebe ermöglicht worden sein. Zum anderen könnten Connexine ihrerseits über zellgebundene molekulare Wechselwirkungen die Tumورprogression beeinträchtigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MSCs nicht für die Herstellung von artifiziellem Herzgewebe geeignet sind, wohl aber für die Herstellung von künstlichen Blutgefäßsystemen. Als sinnvolle Zellalternative bieten sich induzierte pluripotente Stammzellen (IPS-Zellen) an, da deren Differenzierbarkeit zu funktionellen Kardiomyozyten glaubhaft bewiesen werden konnte. Auch IPS-Zellen bergen ein onkogenes Potential. Daher gilt es einheitliche Kontrollen und Sicherheitsmessungen in der Herstellung von pluripotenten wie auch multipotenten Stammzellen für zellbasierte Therapien zu entwickeln und verpflichtend einzuführen.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AEC</b>	3-Amino-9-Ethylcarbazole
<b>AK</b>	Antikörper
<b>Aqua dest.</b>	destilliertes Wasser
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BMCs</b>	bone marrow cells (unfraktionierte Knochenmarkzellen)
<b>BM-MSC</b>	aus dem Knochenmark gewonnene mesenchymale Stammzellen
<b>BMMNCs</b>	bone marrow mononuclear cells (mononukleare Zellen des Knochenmarks)
<b>CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	Calciumchlorid Dihydrat
<b>CEE</b>	chick embryo extract
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>CH<sub>2</sub>O</b>	Formaldehyd
<b>cMSC</b>	kommerziell erworbene mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte
<b>cMSC-ET</b>	Engineered Tissue aus cMSC
<b>CSC</b>	cardiac stem cells
<b>Cx40</b>	Connexin 40
<b>Cx43</b>	Connexin 43
<b>Cx45</b>	Connexin 45
<b>DAPI</b>	4',6-Diamino-2-phenylindol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-Tetraacetat
<b>EGF</b>	endothelial growth factor
<b>EHT</b>	Engineered Heart Tissue
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell scanning (Durchflusszytometer)
<b>FITC</b>	Fluoreszeinisothiocyanat
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>FSC</b>	forward scatter
<b>GJIC</b>	Gap Junction vermittelte interzelluläre Kommunikation
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HE</b>	Hämalaun-Eosin

<b>IPS-Zellen</b>	induzierte pluripotente Stammzellen
<b>HPF</b>	high power field (1 HPF = 0,1734 mm <sup>2</sup> )
<b>HS</b>	horse serum
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>Kg KG</b>	Kilogramm Körpergewicht
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>Klf4</b>	Kruppel-like factor 4
<b>MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O</b>	Magnesiumchloridhexahydrat
<b>MSC</b>	mesenchymale Stammzellen
<b>MSC-ET</b>	Engineered Tissue aus mesenchymalen Stammzellen
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	Natriumdihydrogenphosphat
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O</b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>Oct4</b>	octamer binding transcription factor 4
<b>P/S</b>	Penicillin / Streptomycin
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SEM</b>	standard error of the mean
<b>sMSC</b>	selbst isolierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark der Ratte
<b>sMSC-ET</b>	Engineered Tissue aus sMSC
<b>Sox-2</b>	sex determining region Y (SRY)-box 2
<b>SSC</b>	side scatter
<b>TBS</b>	tris buffered saline
<b>TGF<math>\beta</math></b>	transforming growth factor beta
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TRITC</b>	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
<b>U/min</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor
<b>vWF</b>	Von-Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Gemäß dem Statistischen Bundesamt waren im Jahr 2012, wie schon in den Vorjahren, die koronare Herzkrankheit, der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz die drei häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland [Egeler 2014].

Das adulte menschliche Herz gehört zu den Organen mit sehr limitierten Regenerationsvermögen. Ein signifikanter Myokardverlust ist in den meisten Fällen irreversibel und kann über den fortschreitenden Verlust der Ventrikelfunktion zu einer Herzinsuffizienz führen. Interventionelle und pharmakologische Therapieansätze können das Fortschreiten der Erkrankung aufschieben, aber nicht dessen natürliche Ursache beheben. Schließlich bleibt den Betroffenen im Endstadium der Erkrankung oft nur die Möglichkeit der Herztransplantation. Allerdings schränken die immunologische Verträglichkeit und noch mehr der Mangel an adäquaten Spenderherzen diese Option erheblich ein. Daher wurden in den vergangenen Jahrzehnten andere Strategien entwickelt, mit dem Ziel geschädigtes Herzgewebe zu ersetzen.

Gegenwärtig existieren zwei grundlegende Lösungsansätze die formal zur kardialen regenerativen Medizin gezählt werden. Ersterer befasst sich mit der alleinigen Transplantation von isolierten Zellen unterschiedlichen Ursprunges in geschädigtes Myokardgewebe. Der zweite Ansatz wird als Tissue Engineering bezeichnet und beinhaltet die Herstellung von künstlichen, biologischen Ersatzgeweben unter dem Einsatz von Zellen und extrazellulärem Gewebe unter Laborbedingungen [Zimmermann et al. 2006a].

Bereits 1988 fand, in Lake Tahoe, Kalifornien, der erste wissenschaftliche Kongress über Tissue Engineering statt. Im Zuge dieses Kongresses wurde die folgende Definition verfasst: „Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologischen Säuger-Geweben; und die Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion.“ [Skalak und Fox 1988]

Das Tissue Engineering verfolgt damit das ambitionierte Ziel funktionseingeschränkte oder nicht funktionsfähige Gewebe oder Organe zu regenerieren oder gar zu ersetzen. Bezogen auf kardiale Erkrankungen bedeutet dies die künstliche Herstellung von funktionellen, transplantationsfähigen Myokardgewebes bzw. langfristig die Herstellung vollständiger Herzen als Organersatz.

Am Herzzentrum Leipzig konnte bereits aufbauend auf vorhergehende In-vitro-Studien von Zimmermann et al. unter Einsatz von neonatalen Kardiomyozyten ein dreidimensionales vaskularisiertes Engineered Heart Tissue (EHT) etabliert werden [Zimmermann et al. 2000, 2006b, Nichtitz 2009]. Dieser künstlich hergestellte Ring wurde elektrisch stimuliert und war in der Lage nach 14 Tagen in Kultur selbstständig zu kontrahieren. Im Jahr 2013 wurde dieses EHT in einem Rattenmodell mit dilatativer Kardiomyopathie transplantiert. Vier Wochen nach Implantation konnte eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion des Empfängerherzens sowie eine strukturelle und elektrische Integration des EHTs gezeigt werden [Leontyev et al. 2013].



## 1.2 Alternative Zellsorten für kardiales Tissue Engineering

In Hinblick auf die Einsatzfähigkeit im Menschen ist die Verwendung von neonatalen Kardiomyozyten sowohl immunologisch als vor allem ethisch nicht umsetzbar. Für die Weiterentwicklung des EHTs stellte sich daher die Frage nach einer alternativen Zellsorte. Die ideale Zelle sollte autolog in einer ausreichend hohen Menge verfügbar sein und sowohl phänotypische Qualitäten von Kardiomyozyten als auch von Endothelzellen ausbilden können. Die Tatsache, dass in der myokardialen Regenerationsforschung bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt die verschiedensten Zellsorten zum Einsatz kommen, legt die Vermutung nahe, dass eine solche ideale Zelle noch nicht gefunden wurde.

Skelettmyoblasten waren die erste Zellsorte, die in klinischen Studien in Ischämieareale von Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt injiziert wurden [Menasche et al. 2003]. Die nachfolgende „MAGIC-Studie“ musste abgebrochen werden, da es in der Gruppe mit Skelettmyoblasten-Injektion zur vermehrten Ausbildung von ventrikulären Arrhythmien kam. Nebenbei konnte in derselben Studie keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion in der Myoblasten-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden [Menasche et al. 2008]. Passend dazu konnte in einem Tierexperiment gezeigt werden, dass Skelettmyoblasten nach Ausdifferenzierung nicht in der Lage sind eine elektrische Kopplung zum Empfänger-Myokard auszubilden und damit funktionell isoliert sind [Leobon et al. 2003].

Dagegen konnten embryologische Stammzelltransplantationen die Überlebensrate von Ratten nach Myokardinfarkt signifikant steigern, unter anderem durch eine vermehrte Ausbildung von Blutgefäßen und deren Differenzierung in Kardiomyozyten [Min et al. 2003]. Aufgrund ihrer hohen Proliferationskapazität und ihrer Pluripotenz gehören die embryologischen Stammzellen zu den Hoffnungsträgern des myokardialen Tissue Engineerings. Dennoch sind sie aufgrund ethischer Aspekte international sehr umstritten. So ist es speziell in Deutschland nach dem Embryonenschutzgesetz (ESchG) verboten humane Embryonen zu Forschungszwecken herzustellen, zu klonen oder zu zerstören [Maas 2014].

Zudem ist die Anwendbarkeit in zukünftigen klinischen Studien noch aus zwei weiteren Aspekten fragwürdig. Zum einen ist die Wahrscheinlichkeit für immunologische Abstoßungsreaktionen bedingt durch den allogenen Ursprung erhöht, zum anderen zeigten Studien mit embryologischen Stammzellen, dass diese ein erheblich tumorigenes Potenzial besitzen (Teratombildung) [Saric et al. 2008, Solter 2006, Towns und Jones 2004]. Dem entgegen stehen die autolog und leicht verfügbaren unfraktionierten Knochenmarkszellen (BMCs) und die mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMMNCs). In den Jahren 2002–2007 wurden mehrere klinische Studien zur Transplantation von BMCs oder BMMNCs in Patienten mit kürzlich erlittenen Herzinfarkt veröffentlicht [Assmus et al. 2002, Lunde et al. 2006, Schachinger et al. 2006, Strauer et al. 2002, Wollert et al. 2004] oder ischämischer Kardiomyopathie [Fuchs et al. 2006, Perin et al. 2003]. Nachfolgende Metaanalysen konnten zwar die Sicherheit dieses Therapieansatzes bestätigen, jedoch waren die Therapieerfolge sehr variabel und lagen sowohl über als auch unterhalb derer von konventionellen Therapien [Abdel-Latif et al. 2007, Lipinski et al. 2007]. Entsprechend der Isolationsform enthielten die verwendeten BMCs und BMMNCs eine Mischung von unterschiedlichen Zellpopulationen wie hämatopoetische Stammzellen, hämatopoetische Vorläuferzellen der myeloischen sowie lymphatischen Reihe, endotheliale Progenitorzellen (EPCs) und mesenchymale Stammzellen [Assmus et al. 2002]. Daher lässt sich nicht ableiten, ob einzelne Zellpopulationen oder ob die Gesamtheit aller Zellen für die moderat kardioprotektiven Effekte verantwortlich waren.

Neue Hoffnungen wurden in die erstmals 2003 beschriebenen kardialen Progenitorzellen (CPC) gelegt, welche die Kapazität aufweisen sich in funktionelle Kardiomyozyten zu differenzieren und das Herzgewebe zu regenerieren [Beltrami et al. 2003, Laugwitz et al. 2005].

Gemäß der Veröffentlichung von Beltrami et al. sind diese Zellen vereinzelt in Nischen des adulten Rattenherzens organisiert, weisen eine Positivität für den Stammzellfaktorrezeptor c-kit auf und können sich in Myozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren [Beltrami et al. 2003]. Im Verlauf wurden zusätzliche Oberflächenmarker (sca-1 und isl-1) für CPCs beschrieben [Laugwitz et al. 2005] [Matsuura et al. 2004a]. Bislang konnte nicht sicher festgestellt werden, ob es sich hierbei um verschiedene CPC-Populationen handelt oder ob es schlicht einen dynamischen Phänotyp derselben Population widerspiegelt, sodass eine eindeutige Charakterisierung derzeit ausgeschlossen werden kann [Eschenhagen und Zimmermann 2005].

Darüber hinaus stellen die Beschaffung aus humanem Gewebe und vielmehr noch die suffiziente Kultur von einer ausreichenden Anzahl an CPCs [Messina et al. 2004] gegenwärtig die bedeutendsten Limitationen für deren Einsatz im myokardialen Tissue Engineering dar.

Jüngst wurde eine neue Zellpopulation künstlich entwickelt, die als induzierte pluripotente Stammzellen (IPS-Zellen) bekannt sind. Hierbei handelt es sich um pluripotente Stammzellen, die aus nicht pluripotenten Zellen (meist adulte somatische Zellen) mittels gesteuerter Expression spezifischer Gene unter Laborbedingungen künstlich hergestellt wurden. IPS-Zellen ähneln natürlich vorkommenden pluripotenten Stammzellen, wie den embryologischen Stammzellen, in vielen Eigenschaften wie beispielsweise Morphologie, Proliferation, Oberflächenantigene, Genexpression und die Differenzierbarkeit in Zelltypen aller drei Keimblätter. Über das genaue Ausmaß der Übereinstimmung kann bislang jedoch keine Aussage getroffen werden. Bereits 2006 gelang es der Arbeitsgruppe von Shin'ya Yamanaka aus adulten humanen Fibroblasten IPS-Zellen mittels Reaktivierung der endogenen Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2, Klf4 und c-Myc herzustellen [Takahashi und Yamanaka 2006]. Das entsprechende Protokoll konnte in zahlreichen folgenden Publikationen reproduziert, erweitert und vereinfacht werden. So wurde beispielsweise in der Folge auf das Protoonkogen c-Myc verzichtet und NANOG hinzugenommen. Alle verwendeten Transkriptionsfaktoren werden üblicherweise in Zellen während der Embryonalentwicklung oder in Krebszellen gebildet [Yu et al. 2007]. Diese innovative Methode eröffnet für die Zukunft eine alternative Quelle für humane pluripotente Stammzellen unabhängig von der Verfügbarkeit befruchteter Eizellen.

Die neueste Entwicklung stellt die Reprogrammierung somatischer Zellen zu pluripotenten Zellen durch einen Säureschock dar. Diese Reprogrammierung zu den sogenannten STAP-Zellen (stimulus-triggered acquisition of pluripotency) ist gänzlich unabhängig von Zellkerntransfer oder künstlicher Einführung von Transkriptionsfaktoren. Genanalysen der STAP-Zellen zeigten eine wesentliche Abnahme der DNA-Methylierung in den regulatorischen Bereichen der Pluripotenzenmarkergene. In-vitro-Differenzierungsassays konnten die Differenzierbarkeit in Richtung aller drei Keimblätter nachweisen. Darüber hinaus entstanden nach Injektion von STAP-Zellen in Blastozysten mittels Keimbahntransmission chimäre Embryos, welche als gesunde chimäre Mäuse geboren wurden. Allerdings verfügen die STAP-Zellen gegenüber den embryologischen Stammzellen über eine deutlich geringere Potenz zur Selbsterneuerung und sie befinden sich nur wenige Tage im Stadium der Pluripotenz verglichen mit den IPS-Zellen [Obokata et al. 2014].

Eine weitere Alternative stellen mesenchymale Stammzellen (MSCs) dar. Aufgrund ihrer vielseitigen Eigenschaften wurden MSCs in der Vergangenheit bereits umfangreich im Bereich der kardialen Regeneration erforscht.

### 1.3 Charakterisierung der MSCs

Die Entdeckung der MSCs geht auf Arbeiten zwischen 1960 und 1970 von A. J. Friedenstein zurück. Beim Kultivieren von humanen Knochenmarksupensionen wurden im Zuge mehrzeitiger Wechsel des Kulturmediums die nicht haftenden, hämatopoetischen Zellen sukzessive von Plastik-adhärenenten, Fibroblasten-ähnlichen Zellpopulationen getrennt, die in der Lage waren in Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren. Damit gelang A. J. Friedenstein und seinen Mitarbeitern die erste Isolation und Expansion von humanen MSCs [Friedenstein et al. 1966, 1974].

Inzwischen konnten MSCs erfolgreich aus fast jedem Gewebetyp, wie Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurblut, Haut, Zahngewebe, Skelettmuskel, Gehirn, Milz, Leber, Niere, Lunge, Thymus, Gefäße etc., isoliert werden. Eine Tatsache die da Silva Meirelles et al. zu der Annahme brachten, dass MSCs in nahezu allen postnatalen Organen und Geweben zu finden seien [da Silva Meirelles et al. 2006]. In der Mehrzahl der aktuellen Veröffentlichungen werden MSCs aus dem Knochenmark isoliert (BM-MSCs), obwohl gezeigt werden konnte, dass nur etwa 0,001–0,01 % des gesamten Knochenmarks MSCs entsprechen. Damit sind sie etwa um den Faktor 10 seltener als die ebenfalls im Knochenmark residenten hämatopoetischen Stammzellen [Pittenger et al. 1999]. MSCs werden charakterisiert durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, hohe Expansionsraten in Kultur und die Fähigkeit sich in alle Gewebe mesenchymalen Ursprunges, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten, differenzieren zu können [Chamberlain et al. 2007].

Gegenwärtig ist eine exakte Definition von mesenchymalen Stammzellen schwer zu formulieren, da es an einem spezifischen Oberflächenmarker mangelt. Mit dem Ziel einer Klassifizierung wurden im Jahr 2006 durch das „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy“ drei Minimalkriterien für humane MSCs unter standardisierten Kulturbedingungen vorgeschlagen: (1) Sie müssen Plastik-adhärenent sein, (2) sie sollten in der Durchflusszytometrie die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 exprimieren, hingegen nicht/keine hämatopoetische Oberflächenantigene, wie CD11b, CD79 oder CD14, CD34, CD45 oder CD19 und HLA-DR, und (3) sie sollten imstande sein in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten zu differenzieren, was als Tri-lineage-Differenzierung bezeichnet wird [Dominici et al. 2006].

Seither variiert die phänotypische Charakterisierung in verschiedenen Studien dennoch weiterhin. Besonders über die Zusammenstellung der Oberflächenantigene gilt Uneinigkeit, denn generell werden auch CD44, CD71, Stro-1 und Adhäsionsmoleküle wie CD106 und CD166 akzeptiert [Boyle et al. 2010]. MSCs konnten inzwischen aus vielen unterschiedlichen Spezies, wie Maus, Ratte, Katze, Hund, Kaninchen, Schwein und Pavian, isoliert und kultiviert werden [Javazon et al. 2004]. Dabei zeigte sich, dass nicht alle die exakt gleichen Expressionsmuster wie humane Zellen aufweisen. So gilt zum Beispiel auch das Adhäsionsmolekül CD54 für Ratten-MSCs als Positivmarker [Wan et al. 2008, Zhang und Chan 2010]. Erschwerend zur Beurteilung kommt hinzu, dass Unterschiede in den Expressionsmustern durch sekretorisch aktive Beifangzellen während der initialen Passagen beeinflusst werden könnten [Gronthos et al. 2001]. Daher werden MSCs gemeinhin über deren funktionelle Eigenschaften definiert, wie der Plastikadhärenz und der multiplen Differenzierungskapazität [Boyle et al. 2010]. MSCs weisen eine heterologe Morphologie auf und werden als spindelförmig (häufigste Verwendung), fibroblastoid, fette Riesenzellen, Deckzellen oder sehr kleine runde Zellen beschrieben. Zusätzlich variiert die Morphologie mit der Einsaatdichte und ändert sich dramatisch mit erreichter Konfluenz unter In-vitro-Bedingungen. Bislang konnte nicht geklärt werden, ob eine Beziehung zwischen Aussehen und Zellfunktion existiert [Pevsner-Fischer et al. 2011].

## 1.4 Plastizität der MSCs

Ein maßgebliches Kriterium für die Charakterisierung von MSCs ist deren Fähigkeit sich in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren. Der Ausprägungsgrad der Differenzierungskapazität bestimmt ob eine Stammzelle totipotent, pluripotent oder multipotent ist [Verfaillie et al. 2002].

Unter Totipotenz wird die Fähigkeit zur Bildung eines kompletten Individuums verstanden. Nur die befruchtete Eizelle (Zygote) bis einschließlich der Zellen des 8-Zellstadiums gelten als totipotente Stammzellen [Slobodianski 2006]. Zu den pluripotenten Zellen werden die embryonalen Stammzellen gezählt. Sie entsprechen der inneren Zellmasse (Embryoblast) der Blastozyste, welche sich aus der Zygote entwickelt. Sie sind beim Menschen lediglich etwa vom 4.–7. Tag nach der Befruchtung zu finden. Embryonale Stammzellen sind in der Lage in Zelltypen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Entoderm, Mesoderm) zu differenzieren, können aber keinen vollständigen Organismus ausbilden. Multipotenz wird gemeinhin den adulten Stammzellen zugeschrieben, welche postnatal im gesamten Organismus vorkommen, wie zum Beispiel die hämatopoetischen Stammzellen aber auch die mesenchymalen Stammzellen. Klassischerweise herrschte die Meinung vor, dass sich adulte Stammzellen nur noch in Zelltypen innerhalb des Keimblattes, von dem sie selbst abstammen, differenzieren können. MSCs stammen vom Mesoderm ab und dementsprechend konnten in zahlreichen Publikationen die In-vitro-Differenzierbarkeit in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten gezeigt werden [Pittenger et al. 1999, Toma et al. 2002]. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt 1.3 erläutert, zählt die Tri-lineage-Differenzierung zu den Minimal Kriterien der MSC-Definition [Dominici et al. 2006]. Allerdings handelt es sich bei der Tri-lineage-Differenzierung nicht um eine statische Größe. Vielmehr konnte in verschiedenen Arbeiten eine bedeutende Heterogenität zwischen einzelnen MSC-Präparationen aufgedeckt werden. Spezielle Klonierungsstudien wiesen die Existenz unterschiedlichster Verteilungen von mono-, di- und tripotenten MSCs bezüglich adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierbarkeit nach. Damit einhergehend konnten ebenso unterschiedliche Genexpressionen der diversen MSC-Präparationen nachgewiesen werden [Russell et al. 2010, Phinney et al. 1999, Muraglia et al. 2000]. Die Differenzierbarkeit von MSCs in weitere mesenchymale Zellen, wie Tenozyten [Awad et al. 1999], Fibroblasten [Pittenger et al. 1999] und Skelettmuskelzellen [Chan et al. 2006, Ferrari et al. 1998], wurde unlängst beschrieben. Neuere Studien zeigten zudem, dass unter bestimmten Einflüssen eine Differenzierung auch über die Keimblattgrenzen hinweg möglich ist. Dieser Vorgang wird als Transdifferenzierung bezeichnet und beinhaltet die phänotypische Umwandlung eines Zelltyps in den Zelltyp eines anderen Gewebes [Song und Tuan 2004]. Die Fähigkeit zur partiellen Transdifferenzierung von MSCs in weitere Zelltypen konnte beispielsweise für Neurone [Black und Woodbury 2001, Danielyan et al. 2009], Astrozyten [Kopen et al. 1999], Endothelzellen [Oswald et al. 2004], Hepatozyten [Lee et al. 2004] und Kardiomyozyten [Toma et al. 2002] gezeigt werden.

## 1.5 Einsatz von MSCs in der kardialen regenerativen Medizin

In der kardialen regenerativen Forschung wurden verschiedene Verfahren untersucht, die auf die Differenzierung von MSCs zu Kardiomyozyten abzielen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von 5-Azacytidin. Dieses Zytostatikum ist ein chemisches Analogon zu Cytidin und bewirkt durch den Einbau in die DNA und RNA eine Demethylierung, wodurch ein neues Methylierungsmuster entsteht, was wiederum die Expression von zellregulatorischen Proteinen beeinflussen kann. Unter dem Einsatz der DNA-demethylisierenden Substanz

5-Azazytidin ist es in mehreren In-vitro-Studien gelungen aus Mäuse- oder Kaninchen-MSCs Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, allerdings ohne Querstreifung, zu generieren. In 20–30 % entwickelten sich spontan kontrahierende Zellen, mit myogenem Expressionsmuster, wobei Rangappa et al. auch das kardiomyozytenspezifische Troponin I und Makino et al. Kardiomyozyten-ähnliche Aktionspotentiale nachweisen konnten [Makino et al. 1999, Rangappa et al. 2003]. Dennoch bleiben die genauen Ursachen für die induzierte myogene Differenzierung ungeklärt [Fukuda und Yuasa 2006].

In Anlehnung an die Herstellung der IPS-Zellen induzierten Go et al. eine Überexpression von Sox-2 und NANOG in humanen MSCs. Anschließend zeigte sich erwartungsgemäß eine verbesserte Differenzierbarkeit und Steigerung der Proliferationsfähigkeit der MSCs [Go et al. 2008]. Desweiteren konnten durch die exogen induzierte Expression von Oct-4 aus adulten murinen neuronalen Stammzellen pluripotente Stammzellen generiert werden. Diese 1-Faktor-IPS-Zellen waren in der Lage effizient in Keimzellen und Kardiomyozyten zu differenzieren [Kim et al. 2009].

Eine weitere Alternative zur kardiomyozytären Differenzierung von MSCs mit Hilfe von speziellen Faktoren, ist die Co-Kultivierung von MSCs mit Kardiomyozyten. Getriggert über direkte Zell-Zell-Kontakte und parakrine Sekretion kann eine Ausbildung von kardiomyogenen Proteinen in den MSCs bewirkt werden [Yoon et al. 2005, Peran et al. 2010].

Auf Basis dieser Grundidee wurden in einer Vielzahl von Tiermodellen für akuten Myokardinfarkt, ischämischer Kardiomyopathie oder dilatativer Kardiomyopathie MSCs transplantiert. Die Auswertungen dieser präklinischen Studien ergaben eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion, eine verminderte Infarktgröße und eine verminderte Mortalität bei Mäusen [Kudo et al. 2003, Grauss et al. 2008], Ratten [Imanishi et al. 2008, Berry et al. 2006, Dai et al. 2005, Imanishi et al. 2008], Schweinen [Hatzistergos et al. 2010, Qi et al. 2008, Shake et al. 2002], Kaninchen [Perin et al. 2008, Silva et al. 2005] und Schafen [Hamamoto et al. 2009, Miyahara et al. 2006]. Diese Verbesserungen des kardialen Status wurden trotz minimaler Kardiomyozytendifferenzierungsraten der MSCs beobachtet [Fazel et al. 2005, Toma et al. 2002, Shake et al. 2002].

## 1.6 Duale Rolle der MSCs in der Tumorentwicklung

Neben den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten in der regenerativen Medizin haben die MSCs auch einen wesentlichen Platz in der Tumorforschung eingenommen. Formal handelt es sich um die kontroverse Debatte ob und wie MSCs das Tumorwachstum beeinflussen können.

Diverse In-vivo- und In-vitro-Studien zeigten, dass verschieden charakterisierte MSCs das Tumorwachstum in unterschiedlichen Malignitäten inhibieren konnten [Tian et al. 2010, Wei et al. 2009, Zhu et al. 2009]. Ohlsson et al. verglichen Wachstumsverhalten von subkutan transplantierten Gelatine-Matrizes in Ratten, welche entweder nur aus Kolonkarzinomzellen der Ratte oder aus einem Mix mit zusätzlichen immortalisierten mesenchymalen Vorläuferzellen bestanden. Die mesenchymalen Vorläuferzellen inhibierten das Wachstum der Kolonkarzinomzellen. Besonders bemerkenswert war die Erkenntnis, dass ein Vorhandensein gleicher Anzahl an mesenchymalen Zellen und Tumorzellen das Wachstum des Tumors komplett hemmten. Ein weiterer positiver Effekt zeigte sich bei der Co-Injektion beider Zelltypen, die mit einer verstärkten Infiltration durch Monozyten und Granulozyten einherging [Ohlsson et al. 2003]. Durch intravenöse Injektion von humanen BM-MSCs (CD105+, CD29+, CD44+, CXCR4-, SDF-1-) in einem Maus-Modell für Kaposi-Sarkom konnte das Tumorwachstum über direkten Zell-Zell-Kontakt ebenfalls deutlich gehemmt werden. Als Begründung wurde die Inaktivierung der Proteinkinase B (Zellregulationsprotein) in den Sarkomzellen angeführt [Khakoo et al. 2006].

Indessen wurden kontroverse Berichte veröffentlicht, die den MSCs einen tumorunterstützenden Effekt über Behinderung der Apoptose, Tumorprogression, Metastasenbildung und Resistenzbildung gegen Medikamente in den Tumorzellen attestieren [Wang et al. 2010, Patel et al. 2010, Karnoub et al. 2007, Kurtova et al. 2009, Wei et al. 2009]. So konnten unter anderem Zhu et al. zeigen, dass die subkutane Transplantation von diversen Tumorzelllinien zusammen mit fetalen oder adulten BM-MSCs (CD13+, CD29+, CD44+, CD71+, CD3-, CD14-, CD15-, CD33-, CD34-) in immundefizienten Mäusen zu einem verstärkten Tumorstadium führte [Zhu et al. 2006]. MSCs scheinen aber auch eine duale Rolle in vitro und in vivo einzunehmen. Einerseits führte die Co-Kultivierung von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Tumorzelllinien mit humanen BM-MSCs (CD105+, CD106+, CD73+, HLA-class I+, CD45-) in den Tumorzellen zu einem Zellarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Andererseits verstärkte die Injektion derselben Co-Kulturen in immundefiziente Mäuse das Wachstum des Tumorgewebes im Vergleich zur alleinigen Applikation der Tumorzellen [Ramasamy et al. 2007]. Analoge Beobachtungen machten Tian et al. mit Co-Kulturen aus BM-MSCs (Cyagen Chicago) und Ösophaguskarzinom- oder Lungenkarzinomzellen [Tian et al. 2011].

Neben den beschriebenen tumormodulierenden Eigenschaften konnte für MSCs auch gezeigt werden, dass diese selbst eine Quelle für Tumore darstellen können.

Um eine ausreichende Anzahl an MSCs für klinische Anwendungen zu gewinnen, müssen diese oft mehrfach in vitro passagiert werden. In diesem Zusammenhang veröffentlichten Rubio et al. 2005 erstmalig, dass humane aus Fettzellen gewonnene MSCs unter langfristiger In-vitro-Expansion (Passage 16–20) spontan maligne transformieren können [Rubio et al. 2005]. Auch vielfach passagierte murine BM-MSCs waren spontan in der Lage maligne zu degenerieren und ferner in vivo Fibrosarkome auszubilden [Miura et al. 2006]. Des Weiteren konnten sogar niedrig passagierte murine BM-MSCs numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen durchlaufen und in vivo in verschiedenen Geweben, wie Skelettmuskel, Lunge und Herz, unterschiedlichste Sarkomentitäten bilden, darunter auch unspezifische pleomorphe Sarkome [Aguilar et al. 2007, Tolar et al. 2007, Zhou et al. 2006].

## 1.7 Fragestellungen und Ziele

In der vorangegangenen Dissertation von Martin Nichtitz war es gelungen dreidimensionales Herzgewebe unter Verwendung von neonatalen Kardiomyozyten künstlich herzustellen [Nichtitz 2009] und in Ratten mit dilatativer Kardiomyopathie zu implantieren [Leontyev et al. 2013]. In Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz ist es aus immunologischen und ethischen Aspekten notwendig die etablierten EHTs mit einer alternativen Zellsorte zu generieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden MSCs verwendet, da sie autolog aus fast jedem Körpergewebe gewonnen werden können und somit ethisch und immunologisch unbedenklich sind. Es wurden zwei verschiedene Linien von BM-MSCs der Ratte verwendet und verglichen: selbst isolierte MSCs (sMSCs) und kommerziell erworbene MSCs (cMSCs).

Für den Einsatz der MSCs im Bereich Tissue Engineering sollte untersucht werden, ob es möglich ist, dreidimensionale Engineered Tissues aus BM-MSCs (MSC-ETs) der Ratte in vitro zu züchten. Anschließend sollte dessen Verhalten, Verträglichkeit und Integrität nach vier Wochen in vivo analysiert werden. Dafür wurden die MSC-ETs als allogenes Transplantat direkt um das Herz einer Ratte für einen Zeitraum von vier Wochen implantiert. Als Kontrollgruppe in vitro als auch in vivo dienten konventionelle EHTs aus neonatalen Kardiomyozyten.

### Zusammenfassung der Arbeitsziele

- Kultivierung und Charakterisierung von zwei verschiedenen MSC-Linien der Ratte
- Herstellung eines dreidimensionalen, implantationsfähigen Herzgewebes unter dem Einsatz von zwei verschiedenen MSC-Linien (MSC-ET) und dessen histologische und immunhistologische Charakterisierung im Vergleich zu konventionellen EHTs in vitro
- histologische und immunhistologische Untersuchung der MSC-ETs aus den zwei verschiedenen Zelllinien auf morphologische Umbauprozesse, Integrität und Verträglichkeit nach allogener Implantation in einem 4-Wochen-in-vivo-Modell der Ratte im Vergleich zu konventionellen EHTs in vivo

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte und Hilfsmittel

Geräte/Hilfsmittel	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Absaugeinrichtung	Zellkultur/ Mikrobiologie	NeoLab Heidelberg	DE/Heidelberg
Autoklav	Varioklav 75T	HP Medizintechnik GmbH	DE/ Oberschleißheim
Bauchtuch	45 × 45 cm	NOBA Verbandmittel Danz GmbH & Co. KG	DE/Wetter
Beatmungsgerät	ADS 1000	Engler Engineering Corporation	US/Hialeah
Bottle Top Filter	Nalgene FastCap bottle-top filter unit	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Brutschrank	Typ BB 16 & 16CU	Heraeus Instruments GmbH	DE/Gera
Chirurgische Einmalskalpelle	BB513, BB511	Aesculap	DE/Tuttlingen
Druckeichgerät	367	HSE Products	NO/Egersund
Einbettautomat	Tissue Tek Vip E150/E300	Sakura Finetek Europe B.V.	NL/Alphen aan den Rijn
Einmal-OP-Tuch	59 × 75 cm Rancodrope	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG	DE/Neuwied
Einmal-Rasierer	Med Comfort	AMPri GmbH	DE/Stelle
Eismaschine	2BE 30-10	Ziegra-Eismaschinen	DE/Isernhagen
Elektrische Stimulation	selbst hergestellt	Medizintechnik Herzzentrum Leipzig	DE/Leipzig
Durchflusszytometer (FACS)	LSR II	BD	DE/Heidelberg
Faden	Silk Braided	SMI	BE/St. Vith
Waage	Mikrowaage	Sartorius BP210D	DE/Göttingen
Fotoapparat	PowerShot G5	Canon	GB/Middlesex
Gasflowmeter	1307-8506M-45	Stöckert Instrumente	DE/München



Geräte/Hilfsmittel	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Gefrierschrank	−20 °C	Robert Bosch GmbH	DE/Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank	−80 °C	Robert Bosch GmbH	DE/Gerlingen-Schillerhöhe
Glasplatte	selbst hergestellt	Glasbläserei Kind	DE/Leipzig
Isofluranverdampfer	Vapor 2000	Drägerwerk AG & Co. KGaA	DE/Lübeck
Kanülen Vasofix Safety	16G, 22G	B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Klemmchen	klein	Fine Science Tools GmbH	DE/Heidelberg
Konfokales Laserscanning-Mikroskop	Leica TCS SP2	Leica Camera AG	DE/Solms
Kühlbank für Paraffinschnitte	Typ 70045	Medax Nagel GmbH	DE/Kiel
Kühlschrank	4 °C	Robert Bosch GmbH	DE/Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührer	MR2002	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	DE/Schwabach
Messzylinder	20 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Microtommesser	Typ S22	Feather	JP/Osaka
Mikroskop Hellfeld	Axiovert 25	Carl Zeiss AG	DE/Jena
Mikroskop Hellfeld/Fluoreszenz	Axioplan2 mit AxioCam MRC5, HBO100, HAL100, EBQ100	Carl Zeiss AG	DE/Jena
Mikrowelle	Micro-Chef MO505	Moulinex	DE/Offenbach (Main)
Nadelhalter	MAYO-HEGAR	Medical Highlights Germany GmbH	DE/Rohrdorf
Nahtmaterial	Prolene 8/0 und Vicryl 4/0	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH Ethicon Deutschland	DE/Norderstedt
Neubauerzählkammer		Superior Marienfeld	DE/Lauda-Königshofen
OP Tisch	Scherentisch	Eickemeyer-Medizintechnik für Tierärzte KG	DE/Tuttlingen

Geräte/Hilfsmittel	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Paraffinwanne	Typ 72040	Medax Nagel	DE/Kiel
Radiometer		ABL 700	DK/Kopenhagen
Pflaster	Leukoplast hospital	BSM medical GmbH	DE/Hamburg
pH-Meter	pH Level 1 InoLab	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	DE/Weilheim
pH-Meter	ABL725	Radiometer	DK/Kopenhagen
Pipetus	SP-104-SA-VD	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	DE/Eberstadt
Schlittenmikrotom	HM400R	Microm International GmbH	DE/Walldorf
Schere	klein	B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Schrittmacher-elektroden	VDD-2 5038, IS-1 UNI	Medtronic	
Sicherheitskanüle	Eclipse 0,4 × 13 mm	BD	DE/Heidelberg
Skalpell		B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Spatel	für Intubation	B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Spritze	Plastipeak 50 ml	BD	DE/Heidelberg
Spritze	Discardit 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD	DE/Heidelberg
Spritzenfilter	Porengröße: 0,22 µm <sup>2</sup>	TPP	US/St. Louis
Sternumspreitzer für Kinderchirurgie	MBW-0	Fehling Instruments GmbH & Co. KG	DE/Karstein
Thermostat	MT	Lauda	DE/Königshafen
Tierwaage	S-4001	Denver Instruments/Satorius	DE/Göttingen
Timer	KT188	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Tupfer	Veiwsoft 7,5 × 7,5 cm	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG	DE/Neuwied
Unterlage	60 × 90 cm	Igefa	DE/Ahrensfelde
Vortex Mixer	VM 300	Gemmy Industrial Corporation	CN/Taipei
Wärmebad	Typ1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	DE/Burgwedel

Geräte/Hilfsmittel	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Wärmebad Histologie	Typ24900	Medax Nagel GmbH	DE/Kiel
Wärmeschrank	M400	Memmert GmbH & Co. KG	DE/Schwabach
Wasseraufbereitungsanlage	Q-Gard2	EMD Millipore Corporation	US/Billerica
Zellkulturbank	Typ HS12	Heraeus Instruments GmbH	DE/Gera
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments GmbH	DE/Gera

Tabelle 2.1: Geräte und Hilfsmittel.

## 2.2 Laborutensilien

Laborutensilien	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Autoklavierband	Steri Clin 811509	VP-Group	DE/Feuchtwangen
Deckgläser	18 × 18 mm, 24 × 32 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
EHT-Gießform	selbst hergestellt	Glasbläserei Kind	DE/Leipzig
Einbettform	Tissue Tek III	Sakura Finetek Europe B.V.	NL/Alphen aan den Rijn
Einbettkassetten	K115.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Eppendorfgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Greiner-Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Erlenmeyerkolben	2l	Simax	US/Elk Grove Village
FACS-Rundbodenröhrchen	1205354/352008	BD	DE/Heidelberg
FACS Flow	20l, 342003	BD	DE/Heidelberg
Falcontubes	15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Fettstift	Dako Pen	Dako GmbH	DE/Hamburg
Feuchte Kammer		Wolfgang Weckert Labortechnik	DE/Kitzingen
Filter	100 µm <sup>2</sup>	BD	DE/Heidelberg
Filterpapier	Tissue Tek II SA-4699	Vogel GmbH & Co. KG	DE/Gießen
Glasflaschen	250 ml, 500 ml, 1000 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe

<b>Laborutensilien</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Land/Stadt</b>
Glaspetrischale	60 mm	DURAN Group GmbH	DE/Mainz
Handschuhe	Niril Next Gen	Meditrade	SK/Ljubljana
Klebeband	Time Med	Labeling Systems	US/Oakland
Kanülen 27G	305770	BD	DE/Heidelberg
Knochenschere	10 cm	Fine Science Tools	DE/Heidelberg
Kulturflaschen	75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Kulturplatten	12 Well	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Messbecher	100 ml, 200 ml, 2000 ml	DURAN Group GmbH	DE/Wertheim
Messzylinder	500 ml, 1000 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Mikrotiterplatten	96 Well	TPP AG	CH/Trasadingen
Microtommesser	Typ S22	FEATHER Safety Razor Co., Ltd.	JP/Osaka
Neubauerzählkammer	Depth Profondeur	Superior	DE/Marienfeld
Objektträger	Super Frost Plus	Gerhard Menzel GmbH	DE/Braunschweig
Objektträgerständer		Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
OP-Besteck für Kardiomyozytenpräparation	kleine und große Schere, anatomische und chirurgische Pinzette	Aesculap AG	DE/Tuttlingen
Parafilm M	60631	Pechiney Plastiv Packaging	US/Chicago
Pasteurpipetten	Assistent 567/1	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Petrischalen	60 mm, 94 mm	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Pipetten	0–2,5 µl, 0–10 µl, 10–100 µl, 20–200 µl, 100–1000 µl	Eppendorf AG	DE/Hamburg
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen
Schrittmacher-Elektroden	VDD-2 5038, IS-1 UNI	Medtronic	US/Minneapolis

Laborutensilien	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Serologische Pipettenspitzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	TPP	US/St. Louis
Spritzen	2 ml, 5 ml, 100 ml, 25 ml	BD	DE/Heidelberg
Wiegeschalen	41 × 41 × 8 mm, 89 × 89 × 22 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH	DE/Frickenhausen

Tabelle 2.2: Laborutensilien.

### 2.3 Chemikalien und Biochemikalien

Allgemeine Chemikalien	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Ethanol	vergällt, ≥99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
HCl	37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Isopropanol		Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
KCl		Merck KGaA	DE/Darmstadt
NaCl	>99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
NaOH	>99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Methanol	>99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
TRIS	>99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe

Tabelle 2.3: Allgemeine Chemikalien.

Chemikalien für Zellkultur	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Aqua dest.	Milli Q Academic System	Millipore GmbH	DE/Schwalbach
BSA		Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Glukose Monohydrat D+	für Mikrobiologie	Merck KGaA	DE/Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5239.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe

<b>Chemikalien für Zellkultur</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Land/Stadt</b>
HEPES	>99,5 %	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	>99,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O		Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		Merck KGaA	DE/Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O		Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Silikonkleber	Dow Corning 734	Dow Corning Corporation	US/Midland
Silikonkleber	Steril	Medtronic World	US/Minneapolis
Trypanblau	0,4 %	Life Technologies GmbH/Gibco	DE/Darmstadt

Tabelle 2.4: Chemikalien für Zellkultur.

<b>Nährmedien und EHT-Komponenten</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Land/Stadt</b>
Adipogenesis-Differentiation-Kit	A10070-01	Thermo Fisher Scientific	DE/Darmstadt
Chicken Embryo Extrakt	Frozen CE-650-J	Sera Laboratories International	GB/Cuckfield
Matrigel (extrazelluläre Matrix)		BD, 356234	DE/Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)		Merck KGaA/Biochrom	DE/Berlin
Horse Serum		Thermo Fisher Scientific	DE/Darmstadt
Kollagen	Type I rat tail	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Kollagenase	Typ II	Merck KGaA/Biochrom	DE/Berlin
M199 1-fach	22340	Thermo Fisher Scientific	DE/Darmstadt
M199 2-fach	21157	Thermo Fisher Scientific	DE/Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	5000 IE/ml Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin	Thermo Fisher Scientific	DE/Darmstadt

Tabelle 2.5: Nährmedien und EHT-Komponenten.

## 2.4 Medikamente und Chemikalien für Tierexperimente

Präparatname	Typ	Hersteller	Land/Stadt
Atipam	Atipamezol-hydrochlorid	Eurovet Animal Health B.V.	NL/Bladel
Braunol	Povidon-Jod 7,5 %	Ratiopharm GmbH	DE/Ulm
Buprenovet	Buprenorphin-hydrochlorid	Bayer Vital GmbH	DE/Leverkusen
Ciclosporin A (5 mg/kg KG)	Sandimmun	B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Custodiol Bretschneider's HTK-Solution	Kardioplegielösung	Dr. Franz Köhler Chemie GmbH	DE/Bensheim
Dobutrex	Dobutamine-hydrochlorid	Eli Lilly GmbH	DE/Bad Homburg
Domitor	Medetomidin-hydrochlorid	Janssen Pharmaceutica	BE/Beerse
Dormicum	Midazolam	Ratiopharm GmbH	DE/Ulm
Fentanyl-Janssen	Fentanyl	Janssen-Cilag GmbH	DE/Neuss
Flumazenil Hikma	Flumazenil	Hikma Pharma GmbH	DE/Nieder-Olm
Glukoselösung	40 % Glukose	B. Braun Melsungen AG	DE/Melsungen
Heparin	Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm GmbH	DE/Ulm
Immunoreck	Azathioprine	Hexal AG	DE/Holzkirchen
Novaminsulfon	Metamizol-Natrium	Zentiva Pharma GmbH	DE/Frankfurt (Main)
Optimune Augensalbe		Virbac Schweiz AG	CH/Glattbrugg
Physiologische Kochsalzlösung	0,9 % NaCl	Serumwerk Bernburg AG	DE/Bernburg
Rompun 2 %	Xylazain-hydrochlorid	Bayer Health Care GmbH	DE/Leverkusen
Ubason	Methylprednisolon	Sanofi US	US/Bridgewater
Ursotamin	Ketamin-hydrochlorid	Serumwerk Bernburg AG	DE/Bernburg

Tabelle 2.6: Medikamente und Chemikalien für Tierexperimente.

## 2.5 Versuchstiere

Die neonatalen Ratten für die Herstellung der EHTs wurden aus dem Medizinisch Experimentellen Zentrum (MEZ), der Universität Leipzig bezogen (Tötungsanzeigen T115/08, T05/15). Für den chronischen Tierversuch (TV 35/08) wurden adulte männliche Sprague-Dawley-Ratten (MSC-Isolation) und adulte weibliche Sprague-Dawley-Ratten (EHT-Implantation), die jeweils zwischen 250–350 g wogen, verwendet. Die adulten Tiere wurden ebenfalls vom MEZ bezogen.

## 2.6 Zellen

Die kommerziell erworbenen mesenchymalen Stammzellen (cMSCs) wurden von Thermo Fisher Scientific unter der Katalognummer S1601-100 bezogen. Diese Zellen wurden vom Hersteller unter der Bezeichnung „Gibco Rat (SD) Mesenchymal Stem Cells“ geführt.

### 2.6.1 Herstellerangaben: cMSCs

Bei der verwendeten Zelllinie handelte es sich um mesenchymale Stammzellen, die aus Knochenmark von Sprague-Dawley-Ratten (<8 Wochen) über adhärente Zellkultur gewonnen wurden. Der Hersteller verwendete als Kulturmedium DMEM, Low Glucose, GlutaMAX-I (Gibco 10567-014) mit 10 % MSC-Qualified FBS (Gibco 12662-011).

- Zellzahl je Proberöhrchen:  $\geq 1 \times 10^6$  vitale Zellen
- Volumen und Zusammensetzung: 1 ml, Zellen in Gefriermedium (60 % DMEM, 30 % MSC-Qualified FKS und 10 % DMSO)
- Alter der Zellen: 4. Passage
- Profil der exprimierten Zelloberflächenproteine ermittelt durch FACS
  - Positiv für: CD29, CD44, CD90 und CD106 (>70 %)
  - Negativ für: CD11b, CD34 und CD45 (<5 %)
- Nachweis der Differenzierungsmöglichkeiten in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung

## 2.7 Chemikalien für Histologie

Chemikalien für Histologie	Typ	Hersteller	Land/Stadt
AEC+ Chromogen	High Sensitivity Substrat Chromogen	Dako Deutschland GmbH	DE/Hamburg
Anilinblau-Orange-Eisessig	1109	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Antibody Diluent	S3022	Dako Deutschland GmbH	DE/Hamburg
Aqua dest.	Milli QAcademi System	Millipore GmbH	DE/Schwalbach



<b>Chemikalien für Histologie</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Land/Stadt</b>
BSA	A3059	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	>99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Chicago Sky Blue 6B	201383	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
DAPI	10236276001	Roche Diagnostics GmbH	DE/Mannheim
EDTA		Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Eisen(III)-chloridlösung	nach Weigert B, 0511	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Entellan	1.07961.0500	Merck KGaA	DE/Darmstadt
Eosin G	0,25 % wässrig, 0305	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Essigsäure	3 %	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Fluoreszenz-Eindeckmedium	S3023	Dako Deutschland GmbH	DE/Hamburg
Formaldehyd	säurefrei, ≥37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Hämalaun	nach Mayers	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Hämatoxylinlösung	nach Weigert A, 0910	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
HCl	0,01 %	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Immersionsöl	518F	Zeiss	DE/Jena
Isopropanol	0505	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Kaisers Glyceringelatine		Merck KGaA	DE/Darmstadt
Kernechtrubin	5189	Merck KGaA	DE/Darmstadt
Methylenblau	15943	Certistain	DE/Darmstadt
Natriumcitrat	3580.1	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Oil Red O	O0625	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Paraffin	RotiPlast	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Phosphorwolframsäure	5 % wässrig, 1109	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig
Pikrinsäurelösung	80456	Fluka, Biochemika	DE/Steinheim
Resorcin-Fuchsin-Lösung	nach Weigert 0911	Hollborn & Söhne	DE/Leipzig

<b>Chemikalien für Histologie</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Land/Stadt</b>
Thiazinrot	27419.123	VWR International GmbH	DE/Darmstadt
Triton X-100	9002-93-1	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Tween 20	P1379	Sigma Aldrich und Chemie GmbH	DE/Steinheim
Wasserstoff-peroxid	30 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe
Xylol	>99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	DE/Karlsruhe

Tabelle 2.7: Chemikalien für Histologie.

## 2.8 Primärantikörper

<b>Antigen</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Verdünnung (in Antibody-Diluent)</b>	<b>Hersteller (Codierung)</b>
CD3- $\epsilon$	Ziege	Ratte	1:100	Santa Cruz (SC-1127)
CD20	Ziege	Ratte	1:100	Santa Cruz (SC-7735)
CD45 - FITC markiert	Maus	Ratte	1:250	BD (554877)
CD90/Thy1 Paraffinschnitte	Maus	Ratte	1:100	Abcam (ab225)
CD90/Thy1 Zellkultur	Maus	Ratte	1:400	Abcam (ab225)
Connexin 40	Maus	Ratte	1:100	Chemicon (AB1726)
Connexin 40	Ziege	Ratte	1:100	Santa Cruz (SC-20466)
Connexin 43	Kaninchen	Ratte	1:2000	Sigma (C6219)
Connexin 43	Maus	Ratte	1:200	Chemicon (MAB 3068)
Connexin 45	Maus	Ratte	1:100	Chemicon (MAB3100)
Kardiales Troponin I	Maus	Ratte	1:50	Abcam (ab19615)
Ki-67	Kaninchen	Ratte	1:100	Neomarker (RM9106-s)
Von-Willebrand-Faktor	Kaninchen	Ratte	1:100	Abcam (ab6994)

Tabelle 2.8: Primärantikörper.

## 2.9 Sekundärantikörper

Spezifität	Farbstoff- oder Enzymkonjugat	Verdünnung (in Antibody-Diluent)	Hersteller (Codierung)
Ziege-Anti-Kaninchen	Peroxidase	1:200	Sigma (A9169)
Ziege-Anti-Maus	TRITC (Rot)	1:50	Sigma (T7782)
Ziege-Anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488 (Grün)	1:250	Invitrogen (A11008)
Ziege-Anti-Maus	Alexa Fluor 488 (Grün)	1:250	Invitrogen (A11001)
Esel-Anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488 (Grün)	1:250	Invitrogen (A21206)
Esel-Anti-Ziege	Alexa Fluor 555 (Rot)	1:250	Invitrogen (A-21432)
Ziege-Anti-Maus	Alexa Fluor 555 (Rot)	1:250	Invitrogen (A21422)

Tabelle 2.9: Sekundärantikörper.

## 2.10 Markierte Antikörper für FACS

Antigen	Farbstoff-konjugat	Zugehöriger Isotyp	Verdünnung (in $1 \times \text{PBS}$ )	Hersteller (Codierung)
Anti-Ratte CD45	FITC	Maus IgG1 $\kappa$	$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	BD (550616)
Anti-Ratte CD54	FITC	Maus IgG1 $\kappa$	$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	BD (554969)
Anti-Ratte CD90 Thy1/Thy1.1	FITC	Maus IgG2 $\alpha$	$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	BD (554894)
Anti-Ratte CD34	FITC	Maus IgG 1 $\kappa$	$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	Santa Cruz (sc-7324)
Isotypkontrolle Maus IgG 1 $\kappa$	FITC		$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	BD (550616)
Isotypkontrolle Maus IgG 2 $\alpha$	FITC		$1 \mu\text{g} / 1 \times 10^5$ Zellen	BD (553456)

Tabelle 2.10: Markierte Antikörper für FACS.

## 2.11 Zusammensetzung der Medien

### Stammzellmedium (pH 7,4)

- 50 ml DMEM
- 5 ml FKS
- 1,2 ml P/S
- 62,5 µl Gentamicin

### PBS-Glukose [20 mM]

- 3,6 g Glukose
- gelöst in 1 l 1×PBS

### Verdaulösung

- 40 mg Kollagenase Typ II
- 0,5 g BSA
- gelöst in 50 ml 1×PBS-Glukose

### Stopplösung (pH 7,4)

- 465,5 ml M199 1-fach
- 24,5 ml FKS
- 10 ml P/S

### Medium 1. Tag (pH 7,4)

- 406,7 ml M199 1-fach
- 49,0 ml HS
- 24,5 ml FKS
- 9,8 ml CEE
- 10 ml P/S
- 2,96 g HEPES

### Medium für Konstruktionsmix (pH 7,4)

- 37 ml M199 2-fach
- 10 ml HS
- 2 ml CEE
- 1 ml P/S
- 0,296 g HEPES

### Folgemedium (pH 7,4)

- 426,3 ml M199 1-fach
- 49,0 ml HS
- 9,8 ml CEE
- 4,9 ml FKS
- 10 ml P/S
- 2,96 g HEPES

## 2.12 Allgemeine Lösungen

### 1×PBS-Waschlösung (pH 7,4)

- 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,51 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 7,01 g NaCl
- 0,2 g KCl
- gelöst in 1 l Aqua dest.

### 1×TBS-Waschlösung (pH 7,6)

- 6,57 g Tris
- 8,7 g NaCl
- gelöst in 1 l Aqua dest.

### Fixierlösung für FACS-Analyse

- 1 % Formaldehyd in 1×PBS gelöst

## 2.13 Lösungen für Histologie

### Fixierlösung nach Lillie (pH 7,0)

- 4,5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 8,01 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 100 ml  $\text{CH}_2\text{O}$
- gelöst in 1 l Aqua dest.

### Fixierlösung für Oil-Red-O-Färbung

- 7 % Formaldehyd in 1×PBS

### Fixierlösung für MSC-Zellkultur

- 4 % Formaldehyd in 1×PBS

### Oil-Red-O-Stammlösung

- 0,5 g Oil-Red-O
- 100 ml 99 %igem Isopropanol

### Oil-Red-O-Arbeitslösung

- 30 ml Oil-Red-O-Stammlösung
- 20 ml Aqua dest.

### Methylenblau

- 0,1 g Methylenblau
- 100 ml Aqua dest.

### Pikrinsäure-Thiazinrot

- 100 ml 1,2 %ige wässrige Pikrinsäurelösung
- 7,5 ml 1 %ige wässrige Thiazinsäurelösung

**Kernechtrotlösung**

- 0,1 g Kernechtrubin
- 100 ml Aqua dest.
- 1 ml Eisessig
- nach dem Erkalten filtrieren

**2 % BSA in 1×TBS**

- 0,2 g BSA
- 10 ml TBS (pH 7,6)
- 1 ml aliquotiert und Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$

**0,01 M Natriumcitrat (pH 6,0)**

- 2,94 g Natriumcitrat
- gelöst in 1 l Aqua dest.

**PBST (pH 7,4)**

- 500 µl Tween 20
- gelöst in 1 l 1×PBS

**1 % Triton X 100**

- 0,1 g Triton X 100
- gelöst in 10 ml PBST

**2 % BSA in PBST**

- 0,2 g BSA
- gelöst in 10 ml PBST

**0,25 % Triton X 100**

- 0,025 g Triton X 100
- gelöst in 10 ml 1×PBS

**0,1 % Trypsin + 0,1 %  $\text{CaCl}_2$ -Lösung**

- 0,01 g Trypsin
- 0,01 g  $\text{CaCl}_2$
- gelöst in 10 ml 1×TBS

## 3 Methoden

### 3.1 Verwendete MSC-Linien

Zur Verwendung kamen zwei mesenchymale Stammzelllinien:

- sMSC: selbst isolierte MSCs aus Knochenmark der Ratte (siehe Abschnitt 3.1.1)
- cMSC: kommerziell erworbene MSCs (siehe Abschnitt 2.6.1)

#### 3.1.1 Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus adultem Knochenmark der Ratte (sMSC)

##### 3.1.1.1 Anästhesie der Ratten

Für die Isolation von Knochenmarkstammzellen wurden männliche, 250–350 g schwere Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die zeitlich abgestufte Narkose der Ratten wurde intramuskulär appliziert. Die erste Injektionsnarkose bestand aus Fentanyl (0,005 mg/kg KG), Midazolamhydrochlorid (2 mg/kg KG) und Medetomidinhydrochlorid (0,15 mg/kg KG). Im Anschluss daran erfolgte die Einleitung einer dissoziativen Anästhesie, die sich aus Ketamin (75 mg/kg KG) und nochmalig Medetomidinhydrochlorid (0,5 mg/kg KG) zusammensetzte.

##### 3.1.1.2 Isolation und Kultivierung der sMSCs

Nach der Tötung der Ratte durch die Abtrennung der zu- und ablaufenden Gefäße des Herzens, wurden die Hinterläufe freipräpariert. Die Femurköpfe wurden beidseits vorsichtig aus der Hüftpfanne gelöst, um sie im Ganzen entfernen zu können. Muskel, Sehnen und übriges Bindegewebe wurde mittels Skalpell und Schere von den Ober- und Unterschenkelknochen abgelöst. Nach abgeschlossener Präparation wurden die Knochen in ein mit 1×PBS-gefülltes 50-ml-Falcontube auf Eis überführt. Die getöteten Tiere wurden ordnungsgemäß entsorgt.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter der Zellkulturbank durchgeführt. Von vier 1000- $\mu$ l-Pipettenspitzen wurden 5 mm der Spitze abgeschnitten und jeweils, mit dem abgeschnittenen Ende nach unten, auf vier 15-ml-Falcontubes verteilt. Mit einer Knochenschere wurden die paarigen Femora und Tibiae unterhalb ihrer Epiphysen abgeschnitten, sodass deren Diaphysen als lange gerade Röhren übrig blieben. Jede Diaphyse wurde einzeln, mit dem größten Lumen nach unten zeigend, in ein jeweilig vorbereitetes 15-ml-Falcontube mit Pipettenspitze eingebracht, um eine Stabilisierung der Knochen bei anschließender Zentrifugation (200 g, 5 min, RT) zu gewährleisten. Nach der Zentrifugation wurden die Pipettenspitzen und deren innenliegende Knochendiaphysen mit einer Pinzette entnommen, der Mediumüberstand abgesaugt und das Pellet in 15 ml 1×PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert (200 g, 5 min, RT) [Dobson et al. 1999]. Nach dem Waschschrift mit 1×PBS wurde der Überstand verworfen und das gesamte Knochenmark von vier Knochen mit 40 ml DMEM resuspendiert und mittels eines 100- $\mu$ m<sup>2</sup>-Filters von rückständigen Geweberesten gereinigt. Im Anschluss daran wurde die Knochenmarksuspension auf vier 75-mm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen zu je 10 ml Stammzellmedium ausgesät und bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Damit die MSCs ausreichend Zeit zum adhären hatten, erfolgte der erste Wechsel des Stammzellmediums erst nach drei Tagen. Anschließend wurde das Medium alle 2–3 Tage gewechselt.

### 3.1.2 Auftauen und Kultivierung der cMSCs

Die cMSCs wurden vom Hersteller auf Trockeneis geliefert. Zum Auftauen wurde das gefrorene Kryoröhrchen im Wärmebad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurde die Zellsuspension in Stammzellmedium überführt und zentrifugiert (200 g, 5 min, RT). Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, um eine restlose Entfernung des toxischen DMSO zu gewährleisten. Abschließend wurden die cMSCs gezählt und in einer Dichte von  $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$  in Stammzellmedium ausgesät und bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C im Brutschrank kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 Stunden, da es sich bei den cMSCs bereits um Reinulturen handelte. Anschließend erfolgten die Medienwechsel alle 2–3 Tage.

## 3.2 Subkultivierung der beiden MSC-Linien

Um die Zellkultur beurteilen zu können, wurde diese vor dem Passagieren mikro- und makroskopisch auf Zellmorphologie, Konfluenz, Sterilität, Farbe und Transparenz des Mediums untersucht. Beide Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von 80 % passagiert. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen. Nach dem Ablösen der Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA je Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) für 2 min im Brutschrank bei 37 °C, wurde die Trypsinierung mit der doppelten Menge Stammzellmedium beendet. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei RT und 200 g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 2 ml Stammzellmedium durch hoch- und runterpipettieren gründlich resuspendiert. Anschließend wurde die erhaltene Zellanzahl und deren Vitalität bestimmt. Dafür wurden 10 µl von der Zellsuspension abpipettiert und mit weiteren 10 µl Trypanblau in einem Eppendorfgefäß vermischt und zusammen in eine Neubauerzählkammer eingebracht. Unter dem Mikroskop erfolgte die Zählung von ausschließlich vitalen Zellen (Zellen ohne Aufnahme von Trypanblau).

Die MSCs wurden in einer Dichte von  $6 \times 10^3 / \text{cm}^2$  ausgesät. Die cMSCs hingegen wurden in einer geringeren Dichte von  $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$  ausgesät. Die Zellen wurden wie bisher bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2–3 Tage erfolgte der Wechsel des Stammzellmediums.

## 3.3 Charakterisierung der MSCs

### 3.3.1 Durchflusszytometrische Messungen der MSCs

Um den Nachweis zu führen, dass es sich bei den verwendeten Zellen auch tatsächlich um MSCs handelte, erfolgte deren Charakterisierung unter anderem mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Im Gegensatz zu hämatopoetischen Stammzellen, die CD34 positiv sind [Simmons et al. 1992], gibt es keinen spezifischen Zellmarker für mesenchymale Stammzellen. Jedoch gibt es eine Reihe an Oberflächenantigenen die hinweisend sind für MSCs und ebenso welche die MSCs ausschließen. Deshalb wurde bei der Durchflusszytometrie auf eine Kombination von Positivmarkern (CD54, CD90) und Negativmarkern (CD34, CD45) getestet, die MSCs ausreichend charakterisieren [Hong et al. 2009, Pittenger et al. 1999, Wan et al. 2008, Wang et al. 2005, Zhang und Chan 2010]. CD34 ist ein Zelloberflächenglycoprotein, das vom Endothel kleiner Gefäße exprimiert wird und sich auf pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen wiederfindet [Simmons et al. 1992]. Bei CD45 handelt es sich um ein Transmembranprotein, das von allen Leukozyten präsentiert wird [Charbonneau et al. 1988].

Es wurden 3 verschiedene Zelllinien der sMSCs in der 3. Passage mit der Durchflusszytometrie analysiert. Die cMSCs wurden nur einmal in der 6. Passage mittels FACS analysiert, um die Herstellerangaben zu testen.



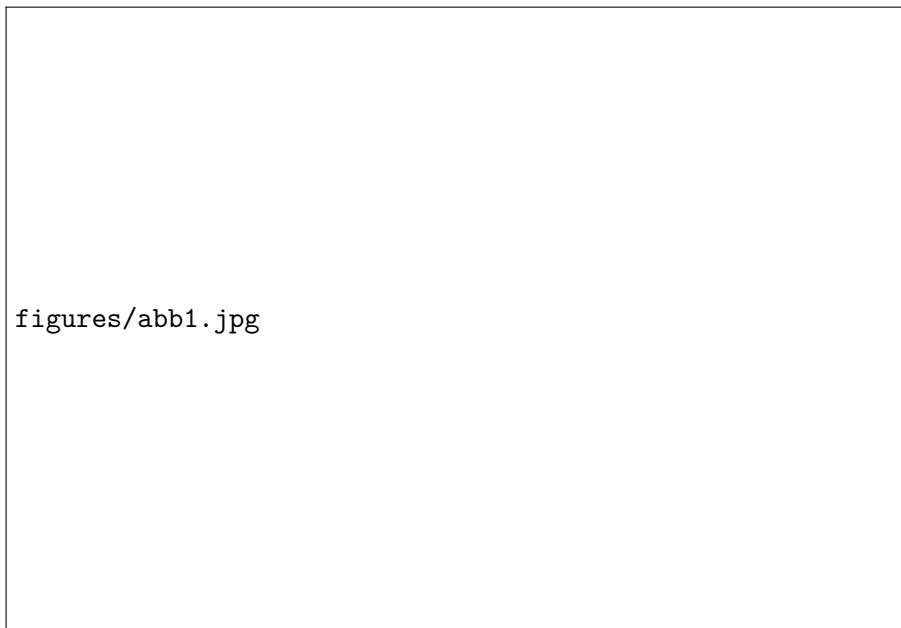


Abbildung 3.1: Dot-Blot Diagramm der cMSCs in der 6. Passage. Kontrollmessung mit Zellen ohne Antikörperbindung. x-Achse: Forward-Scatter (FSC) entspricht der relativen Zellgröße, y-Achse: Side-Scatter (SSC) entspricht der relativen Granularität oder internen Komplexität von Zellen. P1 ist ein festgelegter Messbereich, der die zu messenden MSCs gegenüber Debris und Zellaggregaten abgrenzt.

#### 3.3.1.1 Vorbereitung der Proben

Zunächst erfolgte das Ablösen und Zählen der MSCs (siehe Abschnitt 3.2). Es wurden insgesamt sieben Ansätze getestet: eine Kontrolle ohne Antikörperbindung und sechs Ansätze mit vier zu untersuchenden Antikörpern und zwei dazu passenden Isotypkontrollen (siehe Tabelle 2.10). Pro Ansatz wurden  $1 \times 10^5$  Zellen je 100  $\mu$ l 1 $\times$ PBS eingesetzt. Die Inkubation der entsprechenden Antikörper erfolgte für 15 min bei Dunkelheit. Danach wurden die Suspensionen gemischt und zur Fixierung zu jedem Ansatz 300  $\mu$ l Fixierlösung gegeben.

#### 3.3.1.2 Messung der Proben am Durchflusszytometer

Die Analyse der Proben erfolgte am LSR II (Becton Dickinson) mit Hilfe der Software FACSDiva in Version 6.1.3. Aufgrund der Heterogenität der Zellen erfolgte zunächst von jeder Zelllinie eine Kontrollmessung ohne Antikörperbindung, um die Geräteparameter passend einzustellen. Hierfür wurde zur Identifizierung der gewünschten Zellpopulation ein sogenanntes Dot-Blot-Diagramm erstellt, welches die gemessenen Ereignisse als Punkte darstellte. Jeder aufgetragene Punkt im Diagramm entspricht dem Ergebnis aus gemessenem FSC-Signal (x-Achse) und SSC-Signal (y-Achse) für jedes einzelne Ereignis. Mit dem Forward-Scatter (FSC) wird die relative Größe von Zellen und mit dem Side-Scatter (SSC) die relative Granularität oder interne Komplexität von Zellen abgebildet.

Anhand der grafischen Dot-Blot-Darstellung wurde ein P1-Bereich markiert, um Debris und Zellaggregate von den zu messenden MSCs abzugrenzen (siehe Abbildung 3.1). So wurden bei den nachfolgenden Messungen der antikörpergebundenen Ansätze nur die Zellen berücksichtigt, die sich in dem definierten Messbereich P1 befanden. Je Ansatz wurden  $1 \times 10^4$  Ereignisse gemessen.

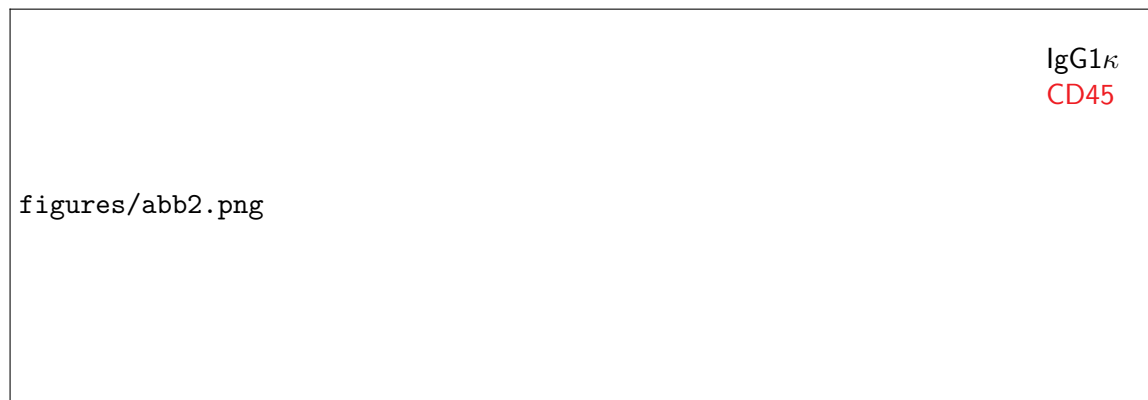


Abbildung 3.2: Histogramm zum Dot-Blot aus Abbildung 3.1. x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: Anzahl der Ereignisse. Die schwarze Kurve entspricht der gemessenen Isotypkontrolle IgG1 $\kappa$ , die rote Kurve entspricht dem gemessenen CD45-Antigen. Die gekennzeichnete Trennlinie ergab sich anhand der Fluoreszenzwerte, die für die Isotypkontrolle IgG1 $\kappa$  der cMSCs gemessen wurden. Alle gemessenen Werte für CD45 links der Trennlinie galten als negativ- und alle rechts davon als positiv-fluoreszierend. In diesem Beispiel waren die cMSCs demnach 0 % positiv-fluoreszierend für CD45.

Nach erfolgter Geräteeinstellung und Bestimmung des P1-Bereiches wurden die Fluoreszenzintensitäten der sechs antikörpergebundenen Ansätze gemessen. Da alle verwendeten Antikörper mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiert waren, erfolgte für jeden Ansatz eine Einzelmessung. Zwei der sechs Antikörper waren Isotypkontrollen, welche zur Ermittlung von unspezifischen Bindungen mitgeführt wurden: Maus IgG1 $\kappa$  für CD34, CD45, CD54 und Maus IgG2 $\alpha$  für CD90 (siehe Tabelle 2.10).

Die Visualisierung der Messwerte erfolgte jeweils mit Hilfe eines Histogramms, in dem die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensitäten auf der logarithmisch skalierten x-Achse aufgetragen wurden. Anhand der zuerst gemessenen Isotypkontrollen wurde eine Trennlinie festgesetzt, die positiv- von negativ-fluoreszierenden Zellen abgrenzte. Somit konnte der prozentuale Anteil der positiv-fluoreszierenden Zellen von P1 bestimmt werden (siehe Abbildung 3.2).

### 3.3.2 Adipozytendifferenzierung der MSCs

MSCs zeichnen sich durch ihre multipotente Kapazität aus, sich in Zellen mesenchymalen Ursprunges ausdifferenzieren zu können. So sind sie in der Lage sich zum Beispiel in Adipozyten zu differenzieren. Dies kann durch Zusatz von 1-Methyl-3-Isobutylxanthine, Dexamethason, Insulin und Indomethacin zum Kulturmedium erreicht werden [Pittenger et al. 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Adipozytendifferenzierung der MSCs mit dem Adipogenesis Differentiation Kit von Gibco durchgeführt.

Bei einer 80-prozentigen Konfluenz der kultivierten MSCs erfolgte deren Ablösung und Zählung (siehe Abschnitt 3.2). Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf eine 12-Well-Platte ausgesät und für 3–5 Tage mit Stammzellmedium kultiviert. Nach Erreichen der vollständigen Konfluenz, erfolgte der Ersatz des bisherigen Mediums durch Adipozytendifferenzierungsmedium, welches alle 2–3 Tage gewechselt wurde. Ein Well diente als Negativkontrolle, indem dieses weiterhin Stammzellmedium erhielt. Die Gesamtkultivierungszeit betrug 3 Wochen.

### 3.3.2.1 Oil-Red-O-Färbung der Adipozyten

Die Testanzahlen und die Zellpassagen je MSC-Gruppe glichen denen der FACS-Analysen (siehe Abschnitt 3.3.1.2). Nach Abschluss der Adipozytendifferenzierung folgte der Nachweis von Lipiden in den differenzierten Zellen mittels der Oil-Red-O-Färbung. Dafür wurde das Medium entfernt und die Monolayer für 30 min in Fixierlösung gegeben. Nach zweimaligen Spülen mit Aqua dest. wurde für 5 min 60-prozentiges Isopropanol (in Aqua dest.) in die Wells gegeben. Nach Entfernung des Isopropanols erfolgte die Färbung der Zellen für weitere 10 min mit der Oil-Red-O-Arbeitslösung. Damit sich nur die Fettvesikel nicht aber die umliegenden Kompartimente rot färbten, wurde zum Differenzieren 60-prozentiges Isopropanol hinzugegeben und die Entfärbung unter dem Mikroskop beobachtet. Nach zufriedenstellendem Ergebnis erfolgte zunächst eine zweimalige Aqua-dest.-Spülung der Zellen und im Anschluss die Kerngegenfärbung für 1 min mit Methylenblau. Zum Schluss wurde die Färbelösung durch zweimaliges Spülen mit Aqua dest. entfernt, um sie dann lufttrocknen zu lassen.

Von jeder zu untersuchenden Zelllinie wurden 20 randomisierte Bilder in 200-facher Vergrößerung der Oil-Red-O-Färbung aufgenommen. Mittels Sigma Scan Pro 5 wurden die Flächen der Adipozyten (rot) und der Gesamtfläche bestimmt. Abschließend konnte aus diesen Werten der prozentuale Flächenanteil der zu Adipozyten differenzierten MSCs ermittelt werden.

## 3.4 EHTs aus neonatalen Kardiomyozyten und mesenchymalen Stammzellen

### 3.4.1 Isolation von neonatalen Kardiomyozyten der Ratte

Für einen Isolationsansatz von neonatalen Kardiomyozyten wurden 10–15 Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die zwischen 12–48 h alt waren. Die Ratten wurden mit einer großen Schere dekapitiert. Der Thorax wurde mit einem nach kaudal gerichteten Schnitt entlang des Sternums eröffnet, ohne dabei das Zwerchfell zu penetrieren. Zur Entnahme wurde das Herz von dessen großen Gefäßen abgetrennt und in eine mit 5 ml 1×PBS-Glukose gefüllte 94-mm-Petrischale, die auf Eis lagerte, überführt.

Nach der Entnahme aller Herzen, wurden diese in der gekühlten Petrischale unter die Zellkulturbank gestellt. Die 1×PBS-Glukose wurde auf ein Drittel abgesaugt. Die Herzvorhöfe wurden mit einer kleinen Schere abgetrennt und verworfen, die übrigen Herzkammern wurden mit derselben Schere auf ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerkleinert.

Die fertige Suspension aus 1×PBS-Glukose und Herzstücken wurde in einem 50-ml-Tube aufgenommen und in acht Schritten verdaut. Im ersten Schritt wurden 7 ml Verdaulösung in dieses Tube dazugegeben und für 2 min in einem Wasserbad bei 37 °C manuell geschüttelt. Im Anschluss wurde das Röhrchen herausgenommen und für ca. 10 s zur Absetzung der groben Bestandteile ruhen gelassen. Der Überstand mit den isolierten Zellen wurde abgenommen, in ein zweites 50-ml-Tube überführt und anschließend mit der äquivalenten Menge an Stopplösung aufgefüllt. Die Stopplösung diente der Blockierung der Kollagenase. Die Durchführung der folgenden sieben Schritte erfolgte gemäß dem beschriebenen Schema, bis alle Herzstücke verdaut waren (siehe Tabelle 3.1).

Zum Abschluss des Kardiomyozytenverdaus waren zwei 50-ml-Tubes mit Zellsuspensionen gefüllt, welche für 5 min bei 700 g und RT abzentrifugiert wurden. Nach Verwerfung des Überstandes wurden die gewonnen Zellpellets mit 10 ml Medium 1. Tag in Lösung gebracht. Diese 10-ml-Zellsuspension wurde auf einer 94-mm-Petrischale ausplattiert und für 30 min bei 37 °C und 50 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert. Bei diesem Vorgehen handelt es

Verdauschritt	Menge an Verdaulösung	Verdauzeit
1	7 ml	2 min
2	7 ml	2 min
3	7 ml	3 min
4	7 ml	4 min
5	7 ml	5 min
6	5 ml	5 min
7	5 ml	5 min
8	5 ml	5 min

Tabelle 3.1: Kardiomyozytenverdau.

sich um das sogenannte Preplating. Dabei werden die individuellen Zeiten von Zelltypen ausgenutzt, die diese benötigen um adhärent zu werden. Fibroblasten und Endothelzellen werden eher adhärent, während Kardiomyozten in Suspension bleiben. Damit wurde der Kardiomyozytenanteil der isolierten Zellen erhöht. Für gewöhnlich beträgt die Zeit für das Preplating zwischen 1–2 h. Nach dieser Zeit würden sich nur noch 1–5 % Fibroblasten in der Zellsuspension befinden. Da Fibroblasten jedoch maßgeblich das Extrazellulargewebe bilden, waren sie unverzichtbar für die Entwicklung eines dreidimensionalen Herzgewebes. Wir entschieden uns daher für eine halbe Stunde Preplating, womit ein Fibroblastenanteil von etwa 20–30 % erreicht wurde, wie es typisch ist für Herzgewebe.

Nach dem 30-minütigen Preplating wurden die nicht haftenden Zellen von der 94-mm-Petrischale in ein 15-ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 700 *g* und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2 ml Medium 1. Tag resuspendiert. Nach erfolgter Zellzählung (siehe Abschnitt 3.2) wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  /ml Folgemedium gebracht.

Die adhärennten Zellen auf der 94-mm-Petrischale wurden mit 10 ml Folgemedium versehen und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank etwa eine Woche als 2D-Kontrolle mitgeführt.

#### 3.4.1.1 Herstellung und Kultivierung eines EHTs mit neonatalen Kardiomyozyten

Für die Herstellung von zwei EHTs wurde der Konstruktionsmix von Nichtitz verwendet [Nichtitz 2009]. Ein Bestandteil des Konstruktionsmix war das zweifach konzentrierte M199 Medium (Gibco 21157). Es stellte den Zellen im EHT ausreichend Nährstoffe zur Verfügung, die sie besonders in der einstündigen Konsolidierungsphase ohne Nährmedium brauchten. Kollagen Typ I und Matrigel bildeten zusammen die formgebende und stabilisierende Extrazellulärmatrix des EHTs, in dem sich die Zellen zu Funktionseinheiten organisierten. Das Kollagen Typ I (Sigma-Aldrich, C7661) wurde aus Rattenschwänzen gewonnen und das Matrigel (BD, 356234) wurde aus Engelbreth-Holm-Swarm-Tumoren der Maus extrahiert, die reich an verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix sind. 0,1 M NaOH wurde dazugegeben um einen physiologischen pH-Wert von 7,4 einzustellen.

Da das Kollagen Typ I und das Matrigel oberhalb von 4–8 °C polymerisieren, wurde der EHT-Mix unterhalb dieser Temperaturen hergestellt. Dafür wurden alle fehlenden Bestandteile bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Unter der Zellkulturbank wurden die Bestandteile des Konstruktionsmix sukzessive in ein 15-ml-Tube pipettiert, der ebenfalls auf Eis lagerte. Die Reihenfolge der Zugabe sowie Konzentrationen und Volumina der Bestandteile sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Reihenfolge	Bestandteile	Konzentration	Volumen
1	Kollagen Typ I	5,5 mg/ml	500 $\mu$ l
2	M199	zweifach	320 $\mu$ l
3	NaOH	0,1 M	70 $\mu$ l
4	Matrigel		200 $\mu$ l
5	Zellen	$5 \times 10^6$ /ml	910 $\mu$ l
$\Sigma$			2000 $\mu$ l

Tabelle 3.2: Konstruktionsmix für zwei EHTs.

Erst als die Zellen abschließend hinzugegeben wurden, erfolgte die langsame Vermischung des Konstruktionsmix zu einer homogenen Lösung. Der fertiggestellte visköse Mix wurde in speziell angefertigte Glaspetrischalen pipettiert, die über ringförmige Aussparungen verfügten. Jede Aussparung war in der Mitte mit einem abnehmbaren Teflonzylinder besetzt und fasste 1000  $\mu$ l des Konstruktionsmix (siehe Abbildung 3.3).

Zum Verfestigen wurden die frisch gegossenen Ringe für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Konsolidierungsphase waren die Ringe weitgehend gefestigt, sodass das Folgemedium hinzugegeben werden konnte ohne dass der Mix in Lösung ging. Die EHTs wurden für 14 Tage kultiviert. Initial wurde das Folgemedium nach 24 h gewechselt und anschließend alle 2–3 Tage.

### 3.4.2 Herstellung und Kultivierung von Engineered Tissues mit sMSCs und cMSCs

Für die Herstellung von MSC-ETs wurden die Kardiomyozyten komplett mit mesenchymalen Stammzellen ersetzt. Es kamen getrennt voneinander zwei unterschiedliche Zelllinien von MSCs zum Einsatz: selbst isolierte sMSCs für sMSC-ETs und kommerziell erworbene cMSCs für cMSC-ETs (siehe Abschnitt 3.1).

Beide Zelllinien wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, passagiert, gezählt und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml Stammzellmedium gebracht. Die sMSCs kamen für das EHT in der 3. Passage zum Einsatz. Da die cMSCs in der 4. Passage geliefert wurden, konnten diese erst nach erfolgter Expansion zur Erhöhung der Zellanzahl in der 6. Passage verwendet werden.

Die Herstellung und Kultivierung der MSC-ETs erfolgte wie in Abschnitt 3.4.1.1 beschrieben. Als alleinige Ausnahme wurde für die Kultivierung der MSC-ETs Stammzellmedium verwendet, anstelle des Folgemediums für reguläre EHTs.

### 3.4.3 Elektrostimulation der kultivierten EHTs und MSC-ETs

Nach einer Kultivierungszeit von sieben Tagen erfolgte eine 6-tägige Elektrostimulation der EHTs mit dem Ziel die neonatalen Kardiomyozyten zu trainieren und die mesenchymalen Stammzellen durch den elektrischen Reiz in Richtung Kardiomyozyten zu differenzieren. Hierfür diente eine selbst gefertigte Apparatur nach dem Vorbild von Nichtitz, die über einen Stimulationsapparat hinsichtlich der Frequenz [Hz], der Impulsweite [ms] und der Stromstärke [mA] eingestellt werden konnte [Nichtitz 2009]. Dafür wurden je vier paarige, unipolare Schrittmacherelektroden in je einen Deckel einer 60-mm-Glaspetrischale mittels Silikon eingefasst und deren Enden mit dem Stimulationsapparat konnektiert (siehe Abbildung 3.4).



Abbildung 3.3: Herstellung von EHTs. (a) Pipettierung des fertiggestellten Konstruktionsmix in zwei ringförmige Silikonaussparungen einer Glaspetrischale unter der Zellkulturbank. (b) Zwei frisch hergestellte EHTs in der Konsolidierungsphase. (c) EHT-Kulturgefäß für sechs EHTs. Jede 60-mm-Glaspetrischale verfügte in der Mitte über eine Silikonaussparung (16 mm Durchmesser, 5 mm Höhe) mit innerem 2-mm-Silikonring. Die dazugehörigen Teflonzylinder waren von dem inneren Silikonring abnehmbar (siehe obere Reihe Petrischalen). Für das Hinzugeben des EHT-Konstruktionsmix mussten die Silikonaussparungen durch den jeweiligen Teflonzylinder (8 mm äußerer Durchmesser, 2 mm innerer Durchmesser, 14 mm Höhe) besetzt sein, sodass Ringformen (16 mm äußerer Durchmesser, 8 mm innerer Durchmesser, 5 mm Höhe) mit einem Volumen von  $754 \text{ mm}^3$  entstanden (siehe untere Reihe Petrischalen) [Zimmermann et al. 2000]. Alle Bestandteile des EHT-Kulturgefäßes konnten autoklaviert und somit mehrfach verwendet werden.

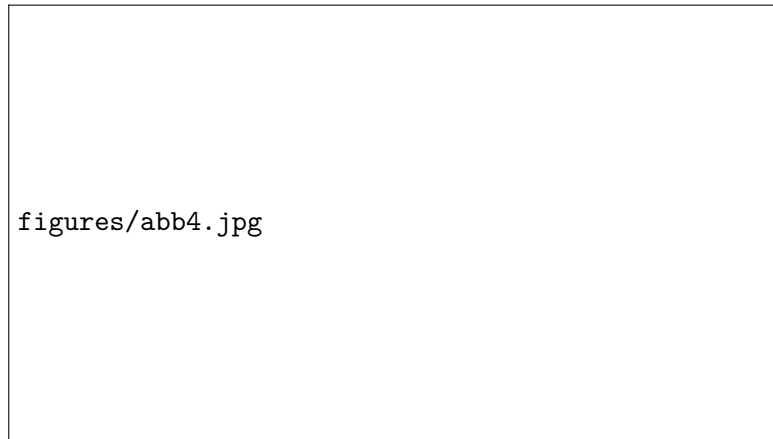


Abbildung 3.4: Stimmulationsapparat.

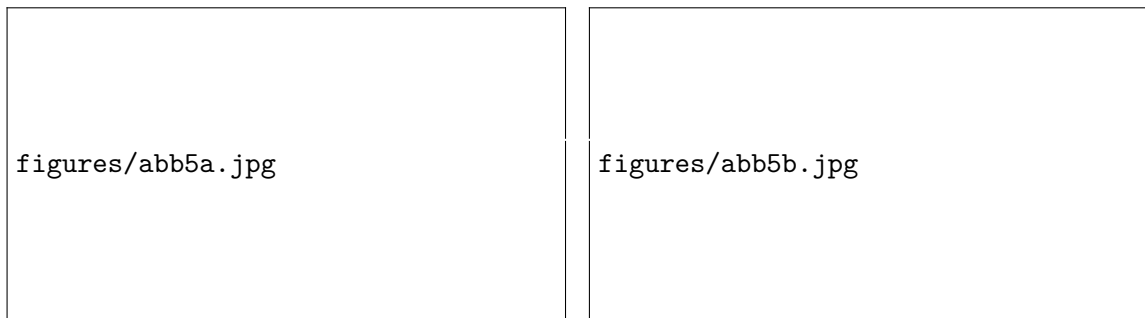


Abbildung 3.5: Selbst gefertigte Apparatur mit vier paarigen Schrittmacherelektroden. (a) Ansicht von oben. (b) Ansicht von der Seite.

Beim Aufsetzen der Deckel auf die Petrischalen kamen so die paarigen Elektroden in der jeweiligen mit Kulturmedium gefüllten Ringform neben dem EHT zum Liegen, was wiederum eine optimale Übertragung des Stromes auf das Gewebe gewährleistete (siehe Abbildung 3.5). Der Stimmulationsapparat wurde für jeden Versuch auf 1 Hz, 1 ms und 1 mA eingestellt.

Die selbst hergestellte Elektrostimulation war wiederverwendbar, sodass sie nach jedem Gebrauch autoklaviert und zusätzlich vor jedem Versuch für 60 min in 70 % Alkohol sterilisiert wurde.

Nach beendeter Stimulation wurden die fertiggestellten EHTs von den Teflonzylindern genommen und für weitere 24 h einzeln in 60-mm-Petrischalen mit 5 ml Medium überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 3.4.4 Implantation der EHTs und MSC-ETs

Nach einer Kultivierungszeit von 14 Tagen, wurden nacheinander 6 von 12 EHTs, 3 von 6 sMSC-ETs und 3 von 7 cMSC-ETs um das schlagende Herz adulter weiblicher Sprague-Dawley-Ratten implantiert. Die Tiere waren in einer kontrollierten Einrichtung mit 12:12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus untergebracht und erhielten eine Standard-Labordiät.

Die Ratten wurden zunächst mit einer kombinierten intramuskulären Applikation von Fentanyl (Hexal, 0,005 mg/kg), Midazolam (Ratiopharm, 2 mg/kg) und Domitor (Orion Pharma, 0,15 mg/kg) anästhesiert. Das Operationsgebiet wurde mittels Nassrasur zugänglicher gemacht (siehe Abbildung 3.6).

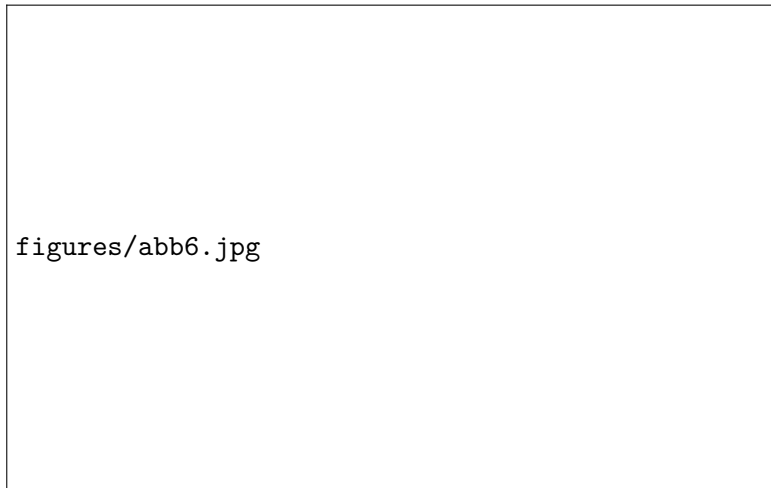


Abbildung 3.6: Sprague-Dawley-Ratte in Injektionsnarkose. In Rückenlage vorbereitet für Inhalationsnarkose und Sternotomie.

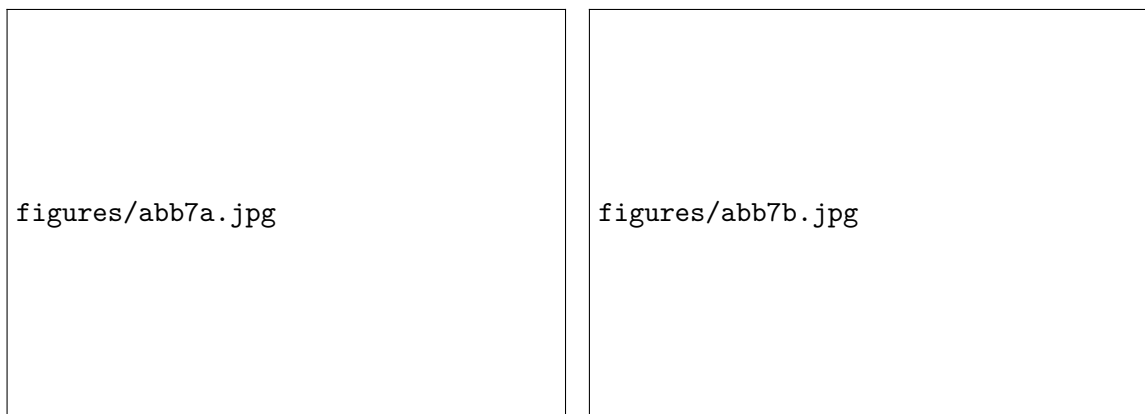


Abbildung 3.7: EHT-Implantation. (a) Blick in den steril abgedeckten Operationssitus: eröffneter Thorax der Sprague-Dawley-Ratte mit direktem Blick auf das Herz, daneben bereitliegendes EHT in Kulturmedium. (b) Über die freipräparierte Herzspitze gelang die Positionierung des EHTs um die Herzventrikel herum.

Nach erfolgter Intubation wurde auf eine Inhalationsnarkose mit initial 1,5 % Isofluran gewechselt, welche im Verlauf auf 0,8–1 % Isofluran ausbalanciert wurde. Über eine Sternotomie erfolgte die Eröffnung des Thorax. Erst ab diesem Punkt wurden die EHTs bzw. MSC-ETs in der mit Kulturmedium gefüllten Petrischale aus dem Zellkulturschrank geholt, um den Nährstoffmangel so gering wie möglich zu halten. Die Operation erfolgte vollständig am schlagenden Herzen. Über die freipräparierte Herzspitze wurde der künstliche Gewebering um die Herzventrikel herum positioniert (siehe Abbildung 3.7) und mit 4–5 Einzelknopfnähten (8/0 Prolene, Ethicon) fixiert. Nach der Implantation erfolgte die Verschließung des Sternums.

Die Tiere verblieben unter postoperativer Beobachtung. Alle 12 Tiere erhielten ab dem Tag der Transplantation bis zur Versuchsbeendigung nach 30 Tagen eine Immunsuppression mit Ciclosporin (Sandimmun, Novartis, 5 mg/kg/Tag), Methylprednisolon (Urbason, Sanofi-Aventis, 5 mg/kg/Tag) und Azathioprin (Hexal, 2 mg/kg/Tag). Für die anschließende histologische Untersuchung erhielten die Ratten nach 30 Tagen eine Injektionsnarkose (siehe Abschnitt 3.1.1.1), um die Herzen zu entnehmen und zu fixieren.



Einbettsschritt	Lösung	Konzentration	Zeit	Temperatur
1	Isopropanol	50 %	1 h	35 °C
2	Isopropanol	70 %	1 h	35 °C
3	Isopropanol	80 %	1 h	35 °C
4	Isopropanol	96 %	1 h	35 °C
5	Isopropanol	96 %	1 h	35 °C
6	Isopropanol	100 %	1 h	35 °C
7	Isopropanol	100 %	1 h	35 °C
8	Xylol	100 %	0,5 h	35 °C
9	Xylol	100 %	0,5 h	35 °C
10	Paraffin		0,5 h	60 °C
11	Paraffin		0,5 h	60 °C
12	Paraffin		1 h	60 °C
13	Paraffin		1 h	60 °C

Tabelle 3.3: Einbettprogramm.

## 3.5 Histologie

### 3.5.1 Fixierung, Einbettung und Schneiden der EHTs und MSC-ETs

Die kultivierten und implantierten EHTs und MSC-ETs wurden in 10 ml Fixierlösung nach Lillie überführt und für 48 h bei 4 °C inkubiert. Nach beendeter Fixierung wurden die Gewebe bis zur Weiterverarbeitung in 70 % Ethanol gelagert.

Um Verdrehungen der Geweberinge zu verhindern, wurden diese einzeln in Filterpapier verpackt und so in Einbettkassetten eingeschlossen. Die implantierten EHTs bzw. MSC-ETs wurden mit dazugehörigem Herzen in Stücke geschnitten und ebenfalls in Einbettkassetten platziert. Daraufhin erfolgte die Einbettung im Tissue Tek Vip (siehe Tabelle 3.3).

Nach abgeschlossener Einbettung wurden die Gewebe mittels Ausgießförmchen in Paraffinblöcke gegossen und bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um ein rissfreies Schneiden zu ermöglichen, erfolgte zunächst eine 20-minütige Lagerung der Blöcke auf der Kühlbank bei −15 °C mit anschließendem Einspannen in das Microtom. Die 4 µm dicken Gewebeschnitte wurden in ein vorbereitetes Wasserbad von 37 °C gelegt, dann einzeln auf Objektträger gezogen und für 12–48 h im Wärmeschränk bei 60 °C getrocknet. Die nachstehende Lagerung erfolgte bei RT.

### 3.5.2 Hämalun-Eosin-Färbung

Aufgrund der sehr guten Eignung für morphologische Untersuchungen wurde die Hämalun-Eosin-Färbung als histologische Übersichtsfärbung eingesetzt. Hierfür wurden die Paraffinschnitte zunächst für zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %) für je 3 min. Nach einem 2-minütigen Spülen wurden die Schnitte 13 min mit Hämalun gefärbt. Hämalun wird aus dem natürlichen Farbstoff Hämatoxylin gewonnen und färbt alle sauren Strukturen rötlich braun an, wie die in den Zellkernen befindliche DNA. Zur Erhöhung des pH-Wertes wurden die Schnitte für 10 min in Leitungswasser eingestellt, wodurch der Farbton in das typische Blauviolett umschlug. Nach einem kurzen Spülen in 0,1 %iger HCL folgte die 7-minütige Gegenfärbung mit dem synthetischen Farbstoff Eosin G (wässrig, 0,25 %), der besonders die basischen Bestandteile wie die Zytoplasmaproteine rot anfärbte.

Die gefärbten Schnitte wurden für 1 min in Aqua dest. gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) für je 3 min entwässert. Schließlich wurden die Gewebeschnitte durch das organische Lösungsmittel Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt [Mulisch und Welsch 2010a].

Zusätzlich diente die HE-Färbung dem Grading des Weichteiltumors. Für die Auswertung der Mitoseaktivität wurden 10 randomisierte High Power Fields ( $1 \text{ HPF} = 0,1734 \text{ mm}^2$ ) aufgenommen und die Zellen, die sich in der Mitose befanden, ausgezählt.

#### 3.5.3 Modifizierte Elastika van Gieson Färbung

Die sogenannte Elastikafärbung diente zur Darstellung von elastischen Fasern. Diese wurde wegen der besseren Haltbarkeit mit Pikrinsäure-Thiazinrot kombiniert, statt mit dem herkömmlich verwendeten Pikrofuchsin.

Elastische Fasern zählen zu den strukturdichtesten Anteilen des Organismus und verfügen dementsprechend nur über sehr schmale Strukturlücken. Sie setzen sich zusammen aus dem polymeren Protein Elastin und dem Glykoprotein Fibrillin. Durch Grenzflächenadsorption lagert sich der positiv geladene Farbstoff Resorcinfuchsin elektropolar an die stark sauren und damit negativ geladenen elastischen Fasern an. Die elastischen Fasern stellen sich in der Übersicht dunkelviolett dar.

Zur Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte zuerst für 10 min und danach für 3 min in Xylol eingestellt. Danach folgte eine Rehydrierung für jeweils 3 min mittels einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 % Ethanol). Im Anschluss erfolgte die erste Färbung für 20 min in Resorcinfuchsin. Nach einer Spülung in Leitungswasser und einer 3-minütigen Waschung in Aqua dest. wurde die 5-minütige Braunfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin nach Weigert angeschlossen. Danach wurden die Gewebeschnitte mit Aqua dest. gespült und für 10 min in lauwarmes Leitungswasser gestellt.

Zur Gegenfärbung wurde abschließend das kollagene und muskuläre Bindegewebe sichtbar gemacht, wobei sich Kollagen rot und Muskelzellen gelb darstellten. Dafür wurden die Paraffinschnitte für 5 min in Pikrinsäure-Thiazinrot gefärbt und anschließend für 2 min in Aqua dest. eingestellt. Um den Pikrinsäureüberschuss auszuspülen wurden die Objektträger für 5 min in 96 %igen Ethanol eingestellt. Zum Abschluss wurden die Objektträger mit 100 %igen Ethanol entwässert, zweimalig in Xylol aufgehellt und mit Entellan eingedeckt [Mulisch und Welsch 2010b].

Je EHT wurden 9 Bilder in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Dies entsprach einer Gesamtfläche von  $1,2934 \text{ mm}^2$  je EHT. Aus dieser Gesamtfläche konnte der relative Anteil an elastischen Fasern bestimmt werden.

#### 3.5.4 Azan-novum-Färbung nach Geidies

Die Azan-Novum-Färbung nach Geidies wurde herangezogen, um den muskulären und kollagenen Gewebeaufbau der EHTs in vitro und in vivo zu quantifizieren. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zuerst für zweimal 5 min in Xylol entparaffiniert und für jeweils 5 min in eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 %) und in Aqua dest. eingestellt. Danach wurde auf die Objektträger für 7 min Kernechtrubinlösung gegeben, das zu einer Rotfärbung der Zellkerne führte. Nach einem kurzen Abspülen in Aqua dest. wurden die Objektträger für 3 min in 5 %ige Phosphorwolframsäure eingebracht und anschließend wieder mit Aqua dest. gespült. Danach wurden die Objektträger für 5–7 min in Anilinblau-OrangeG eingestellt und nach einer wiederholten Spülung mit Aqua dest. in 96 %igen Ethanol differenziert. In den letzten Schritten wurden die Gewebeschnitte 5 min in Isopropanol entwässert, 5 min in Xylol aufgehellt und mit Entellan eingedeckt [Burck 1981].

Je EHT wurden 9 Bilder in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Dies entsprach einer Gesamtfläche von 1,2934 mm<sup>2</sup> je EHT. Aus dieser Gesamtfläche konnte der relative Anteil an Kollagen- (blau) und Myozytenflächen (orange-rötlich) bestimmt werden.

#### Ergebnisse

- Zellkerne, Erythrozyten, Gliafibrillen: rot
- Kollagenes und retikuläres Bindegewebe: blau
- Muskelgewebe: orange bis rötlich
- Zellgranula: orange, rot oder blau

#### 3.5.5 Immunfärbungen

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurde die indirekte Methode mit zwei Antikörpern angewandt. Dabei wird zunächst ein unmarkierter Primärantikörper, der sich gegen ein spezifisches Antigen richtet, auf den zu untersuchenden Gewebeschnitt gegeben. Nach beendeter Inkubation wird ein markierter Antikörper (Sekundärantikörper) hinzugefügt, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist.

Für die immunhistochemische Färbung wurde in dieser Arbeit ein Sekundärantikörper verwendet, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase konjugiert war. Wasserstoffperoxid dient der Peroxidase als Substrat. Wenn nun im letzten Schritt das farblose Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) hinzugegeben wird, oxidieren die freiwerdenden Protonen das Substrat zu einem schwer löslichen rosaroten Endprodukt unter Bildung von Wasser. Somit wird das gesuchte Antigen über eine visuelle Farbreaktion nachgewiesen. Bei den Immunfluoreszenzfärbungen wurde zur Visualisierung der spezifischen Antigene auch die indirekte Methode mit zwei Antikörpern gewählt.

Der Unterschied zur immunhistochemischen Färbung besteht darin, dass der Sekundärantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, wodurch keine enzymatische Reaktion dazwischen geschaltet werden muss, um das Antigen sichtbar zu machen [Junqueira und Caneiro 1996].

Bei den immunhistochemischen sowie Immunfluoreszenzfärbungen wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt. Dafür wurde ein Präparat statt mit einem Primärantikörper mit einer Pufferlösung inkubiert, um auszuschließen, dass der Sekundärantikörper falsch positiv bindet. Alle Antikörper wurden mit Antibody Diluent (Dako) verdünnt.

##### 3.5.5.1 Vorbehandlung

Die 4 µm dicken Paraffinschnitte wurden zur gründlichen Entfernung des Paraffins dreimal für 10 min in Xylol gestellt und im direkten Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 %, 95 %, 70 % Ethanol für jeweils 5 min rehydriert. Nach einem 5-minütigen Spülvorgang in Aqua dest. und einem 10-minütigen Waschschriff in 1×TBS wurden die Präparate mittels einer Mikrowellenbehandlung in 0,01 M Natriumcitrat (pH 6,0) für 30 min bei 600 Watt permeabilisiert. Zum Abkühlen wurden die Schnitte für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach folgte eine weitere Waschung für 10 min in 1×TBS.

##### 3.5.5.2 Von-Willebrand-Faktor

Um Gefäße in den EHTs in vitro und in vivo sichtbar zu machen, erfolgte der immunhistochemische Nachweis des Glykoproteins Von-Willebrand-Faktor, welches von Endothelzellen gleichzeitig synthetisiert und exprimiert wird.

Nach der Vorbehandlung (siehe Abschnitt 3.5.5.1) wurden die Präparate mit einer Lösung aus 60 % Methanol, 40 % 1×TBS und 0,3 % Wasserstoffperoxid für 10 min inkubiert, um die endogene Peroxidase des Gewebes zu unterdrücken. Nach einem 10-minütigen Waschschriff wurde die Blocklösung für 1 h auf die Präparate gegeben. Dies diente zur Blockierung der unspezifischen Bindungsreaktionen an freien reaktiven Gewebsantigenen. Anschließend wurde der Von-Willebrand-Faktor-Antikörper (1:100, Abcam) auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte, nach 30 min Aufwärmen bei RT, dreimal für jeweils 5 min in 1×TBS gewaschen. Danach folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-Peroxidase-konjugiert (1:200, Sigma). Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min in 1×TBS wurde für 10 min das AEC-Chromogen auf die Präparate gegeben und im Anschluss mit Aqua dest. abgespült. Für die Kerngegenfärbung wurden die Präparate für 3 Sekunden in Mayers Hämalaun getaucht und anschließend 3 min unter fließenden, lauwarmen Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Präparate mit Glyceringelatine eingedeckt.

Für die quantitative Auswertung wurden je EHT 8 Bilder in 200-facher Vergrößerung aufgenommen. Dies entsprach einer Gesamtfläche von 1,1497 mm<sup>2</sup> je EHT. Schließlich wurde die Anzahl der Gefäße pro mm<sup>2</sup> ermittelt. Um den qualitativen Unterschied der Gefäßexpression im In-vitro- und In-vivo-EHT statistisch festzuhalten, wurden Gefäße nach ihrer Größe in drei Kategorien unterteilt: Anzahl Gefäße mit einem Perimeter von 0–50 µm, Anzahl Gefäße mit einem Perimeter von >50–100 µm und Anzahl Gefäße mit einem Perimeter von >100 µm. Außerdem wurden die Perimeter und Wanddicken der Gefäße als Mittelwerte bestimmt.

#### 3.5.5.3 Cx43, Troponin I und DAPI

Zur vergleichenden Studie wurden die EHTs und MSC-ETs in vitro und in vivo auf die kardialen Marker Connexin 43 und Troponin I getestet. Für diese Färbung wurde die gleiche Vorbehandlung, wie in Abschnitt 3.5.5.1 beschrieben, angewandt. Zur Vermeidung der unspezifischen Hintergrundfärbung wurden die Schnitte für 1 h mit 2 % BSA inkubiert. Im Anschluss wurde die Primärantikörperverdünnung gegen Cx43 (Kaninchen, 1:2000, Sigma) und Troponin I (Maus, 1:50, Abcam) auf die Gewebeschnitte gegeben und bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am Folgetag schlossen sich 30 min Inkubation bei RT in der feuchten Kammer und eine dreimalige Waschung für jeweils 5 min mit 1×TBS an. Danach wurde das Gemisch aus Sekundärantikörpern auf die Objektträger gegeben: Alexa Fluor 488-Ziege-Anti-Kaninchen (1:250, Invitrogen) und Ziege-Anti-Maus-TRITC (1:50, Sigma). Nach einstündiger Inkubation wurden die Objektträger dreimalig für je 5 min mit 1×TBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mittels verdünnter DAPI-Lösung (1:100000 in 1×TBS) für 5 min angefärbt. Es folgte ein 5-minütiger Waschschriff in 1×TBS. Schließlich wurden die Gewebeschnitte mit DAKO-Mounting-Medium versiegelt und an den Rändern der Deckgläschen mit Acryllack abgedichtet.

#### 3.5.5.4 CD90 und DAPI von Paraffinschnitten

Die sMSC-ETs und cMSC-ETs wurden in vitro und in vivo auf die Expression des Stammzellmarkers CD90 überprüft, um eventuelle Differenzierungsprozesse der Zellen nach der Transplantation feststellen zu können. Die Vorbehandlung dieser Färbung unterschied sich von der, wie sie in Abschnitt 3.5.5.1 beschrieben wurde darin, dass als Waschlösung 1×PBS verwendet wurde und die Präparate für 30 min in 1 % Triton X 100 bei RT permeabilisiert

wurden. Danach folgte die Blockung mit 2 % BSA in PBST für 1 h in der feuchten Kammer. Anschließend wurde die AK-Verdünnung gegen CD90 (1:100, Maus, Abcam) auf die Objektträger gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am Folgetag wurden die Gewebeschnitte zunächst für 30 min bei RT aufgewärmt. Nach einem dreimaligen Waschschrift in 1×PBS für je 5 min, wurden die Gewebeschnitte mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Ziege-Anti-Maus (1:250, Invitrogen) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen durch dreimaliges Waschen in 1×PBS für je 5 min unterbunden. Die Eigenfluoreszenz der Gewebeschnitte wurde durch eine einminütige Färbung mit 1 % Chicagoblau in 1×PBS unterbunden. Die Kernfärbung wurde mittels DAPI (1:100000 in 1×PBS) durchgeführt und es folgte der letzte Waschschrift für 5 min in 1×PBS. Abschließend wurden die Schnitte wie bei allen Fluoreszenzfärbungen in DAKO-Mounting-Medium eingedeckt und mit Acryllack versiegelt.

#### 3.5.5.5 CD90 und DAPI von MSC-Zellkultur

Zur differenzierteren morphologischen Analyse der unterschiedlichen MSC-Linien erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung der In-vitro-Kulturen gegen den mesenchymalen Stammzellmarker CD90. Dafür wurden in den MSC-Kulturen Deckgläschen mitgeführt, auf denen die MSCs adhären konnten. Zum Zeitpunkt der Passage wurden die bewachsenen Deckgläschen in eine neue Petrischale überführt, gründlich mit 1×PBS gespült und anschließend für 15 min in 4 % Formaldehyd fixiert. Die Deckgläschen wurden mit eisgekühlten 1×PBS zweimal für 10 min gewaschen und anschließend 10 min bei RT mit 0,25 % Triton X 100 permeabilisiert. Es folgte eine dreimalige Waschung mit 1×PBS für 5 min und eine 30-minütige Blockung. Danach wurde der primäre Antikörper gegen CD90 (1:400, Maus, Abcam) auf die Zellen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Deckgläschen dreimal für jeweils 5 min gewaschen, um sie dann mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488-Ziege-Anti-Maus (1:250, Invitrogen) wieder für 1 h bei RT zu inkubieren. Der Antikörperüberschuss wurde durch dreimaliges Waschen mit 1×PBS für je 5 min entfernt. Die Kernfärbung wurde wieder mittels DAPI (1:100000 in 1×PBS) durchgeführt und es folgte der letzte Waschschrift für 5 min in 1×PBS. Zum Eindeckeln wurden die Deckgläschen mit Fluorescence-Mounting-Medium auf der mit Zellen beschichteten Seite versehen und dann mit derselben Seite auf einen Objektträger gedrückt.

#### 3.5.5.6 DAPI mit jeweils Cx40, Cx43 oder Cx45

Eine von drei mit cMSC-ET-transplantierten Ratten entwickelte ein Malignom, welches das gesamte Herz umrahmte und teilweise infiltrierte. Um die Gap-Junction-Kommunikation zwischen invasiv wachsendem Tumorgewebe und Herzgewebe zu analysieren, wurden die drei kardialen Connexine Cx40, Cx43 und Cx45 mit den folgenden Färbungen sichtbar gemacht.

Die Doppelfärbung gegen Cx43 glich dem Protokoll, welches bereits im vorhergehenden Abschnitt 3.5.5.3 beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass auf die Troponinfärbung verzichtet wurde. Die Cx40-Doppelfärbung wurde durchgängig mit 1×TBS und die Cx45-Doppelfärbung mit 1×PBS gewaschen. Die Vorbehandlung für die Cx40-Doppelfärbung unterscheidet sich von der, die in Abschnitt 3.5.5.1 beschrieben wurde darin, dass die Präparate für 15 min in einer 1×TBS-Lösung mit 0,1 % Trypsin plus 0,1 % CaCl<sub>2</sub>-Lösung bei RT permeabilisiert wurden. Für die Cx45-Doppelfärbung wurde die gleiche Vorbehandlung wie für die Fluoreszenzfärbung gegen CD90 angewandt (siehe Abschnitt 3.5.5.4).

Primär-Antikörper	Ki-67 + Cx43	Ki-67 + Cx40	Ki-67 + Cx45
Sekundär-Antikörper	1:250 Alexa Fluor 488 Affe gegen Kaninchen	1:250 Alexa Fluor 488 Affe gegen Kaninchen	1:250 Alexa Fluor 488 Affe gegen Kaninchen
	+	+	+
	1:250 Alexa Fluor 555 Ziege gegen Maus	1:250 Alexa Fluor 555 Esel gegen Ziege	1:250 Alexa Fluor 555 Ziege gegen Maus

Tabelle 3.4: Antikörpermischungen.

Nach den individuellen Vorbehandlungen wurden die AK-Verdünnungen für die jeweilige Färbung Cx40 (1:100, Maus, Chemicon) und Cx45 (1:100, Maus, Chemicon) auf die Objektträger gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Gewebeschnitte zunächst für 30 min bei RT aufgewärmt. Nach einem dreimaligen Waschschritt für je 5 min wurden die Gewebeschnitte mit dem gleichen Sekundärantikörper Alexa Fluor 488-Ziege-Anti-Maus (1:250, Invitrogen) für 1 h bei RT inkubiert. Die unspezifischen Bindungen wurden durch dreimaliges Waschen für je 5 min unterbunden. Die Eigenfluoreszenz der Gewebeschnitte wurde durch eine einminütige Färbung mit 1 % Chicagoblau in 1×PBS unterbunden. Die einminütige Kernfärbung wurde mittels DAPI (1:100000 in 1×PBS) durchgeführt und es folgte der letzte Waschschritt für 5 min. Abschließend wurden die Schnitte in DAKO-Mounting-Medium eingedeckt und mit Acryllack versiegelt.

Zur Auswertung wurden für jede der drei Färbungen 100 Zellen je Lokalisation (Tumor, Tumor-Herz-Grenze) randomisiert ausgezählt und somit die jeweilige prozentuale Connexin-Expression bestimmt.

### 3.5.5.7 Ki-67 und DAPI mit jeweils Cx40, Cx43 oder Cx45

Die drei Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 und den kardialen Connexinen Cx40, Cx43 und Cx45 wurden durchgeführt, um zwei Fragestellungen zu klären. (1) Wie waren die verschiedenen kardialen Connexine im Tumor, an der Tumor-Herz-Grenze und im Herzen selbst verteilt und (2) bestand eine Abhängigkeit zwischen Nichtexpression der Connexine und Proliferation der Zellen?

Für alle drei Fluoreszenzfärbungen wurde die Vorbehandlung, welche in Abschnitt 3.5.5.1 beschrieben steht, angewandt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit den Primärantikörpermischungen Ki-67 (1:100, Kaninchen, Neomarker) mit entweder Cx43 (1:200, Maus, Chemicon), Cx40 (1:100, Ziege, Santa Cruz) oder Cx45 (1:100, Maus, Chemicon) inkubiert.

Am Folgetag schlossen sich eine halbstündige Inkubation bei RT in der feuchten Kammer und eine dreimalige Waschung für jeweils 5 min mit 1×TBS an. Im Anschluss wurden die passenden Gemische aus sekundären Antikörpern, wie in Tabelle 3.4 aufgelistet, auf die Gewebeschnitte gegeben. Abschließend wurde, wie in Abschnitt 3.5.5.4 beschrieben, weiter verfahren.

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden für jede der drei Färbungen 100 Zellen je Lokalisation (Tumor innen, Tumor-Herz-Grenze) randomisiert ausgezählt und einer von vier Gruppen zugeteilt: (1) positiv für Ki-67 und Connexin, (2) nur für Ki-67 positiv, (3) nur für Connexin positiv und (4) negativ für Ki-67 und Connexin.

### 3.5.5.8 CD3, CD20 und CD45

Zur genaueren Eingrenzung der Tumorentität erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung auf die drei Markerproteine CD3, CD20 und CD45, die spezifisch für ein Lymphom beziehungsweise Leukozyten sind. Als Positivkontrolle wurde Milzgewebe der Ratte, welches reich an Leukozyten ist, verwendet.

CD3 und CD20 wurden immunhistochemisch mit der Peroxidase-AEC-Färbung nachgewiesen. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend Abschnitt 3.5.5.3 durchgeführt. Als Primärantikörper wurden CD3 (1:100, Santa Cruz) und CD20 (1:100, Santa Cruz) verwendet. Für beide Färbungen wurde der Sekundärantikörper Anti-Ziege-Peroxidase-konjugiert (1:200, Sigma) eingesetzt.

Mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung wurden CD45-positive Zellen nachgewiesen. Alle Zellkerne wurden mittels DAPI detektiert. Die Arbeitsschritte entsprachen ebenfalls denen, wie sie in Abschnitt 3.5.5.3 beschrieben wurden. Es wurde ein primär FITC-markierter Antikörper, der gegen CD45 gerichtet war (1:250), verwendet. Dementsprechend handelte es sich hierbei um einen direkten Nachweis von CD45 und es konnte auf den Einsatz eines Sekundärantikörpers verzichtet werden.

### 3.5.6 Auswertung der Histologie

Für jede histologische Untersuchung wurden die Axiocam MRc 5, das Axioplan 2 Mikroskop und Axiovision Version 4.6.3 als Software verwendet. Für die graphischen Analysen wurde Sigma Scan Pro 5 eingesetzt.

## 3.6 Textverarbeitung und statistische Auswertung

Zur Textverarbeitung wurde L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X (Version 3.1415926-2.4-1.40.13, TeX Live 2012) verwendet. Balkendiagramme wurden mit R (Version 3.1.1, The R Foundation for Statistical Computing) erzeugt. Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

Es wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse gerechnet für die drei Faktoren: Zellsorte (Kardiomyozyten, mesenchymale Stammzellen sMSC oder cMSC), In-vitro-/In-vivo-Situation, Abhängigkeit eines nachgewiesenen In-vitro-/In-vivo-Unterschiedes von der Zellsorte und die 12 abhängigen Parameter: Kollagenanteil, Myozytenanteil, Cx43-Expression, Anteil der Elastischen Fasern, Anteil der Gefäßfläche, Gefäßanzahl pro mm<sup>2</sup>, mittlerer Gefäßperimeter, Anteil der kleinsten Gefäßklasse, Anteil der mittleren Gefäßklasse, Anteil der größten Gefäßklasse, mittlere Gefäßdicke und CD90-Expression.

Wenn die ANOVA signifikante Unterschiede aufzeigte, wurden diese im ungepaarten t-Test post-hoc untersucht (SYSTAT, Version 11, SYSTAT-Software, Richmond, USA). Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

Die Ergebnisse zu der Connexin-Expression und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 im Tumorinneren und an der Tumor-Herz-Grenze wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht, wenn Werte über 5 % lagen, ansonsten mit dem Fisher-Exact-Test auf dem Signifikanzniveau 0,05 (GraphPad PRISM Version 4.03, GraphPad Software, San Diego, USA).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der MSCs

#### 4.1.1 Morphologische Analyse und Proliferation der MSCs im Vergleich

Beide MSC-Linien wurden aus dem Knochenmark von Sprague-Dawley-Ratten gewonnen. Die sMSCs wurden in der Passage 3 zur EHT-Herstellung eingesetzt. Die cMSCs wurden kryokonserviert in der Passage 4 geliefert und mussten daraufhin, unter der Maßgabe eine hohe Zellanzahl zu erreichen, noch zweimalig passagiert werden, sodass die cMSCs erst in der Passage 6 eingesetzt werden konnten.

Die Morphologie der beiden MSC-Linien war sehr verschieden ausgeprägt. Während die spindelförmigen cMSCs scharf begrenzt und sehr homogen aussahen, waren die sMSCs deutlich größer und durch die Ausbildung vieler Zellausläufer weniger scharf definiert. Die sMSCs hatten ihrerseits ebenfalls ein homogenes Aussehen, wenngleich nicht jede Zelle nahezu ihrer Nachbarzelle glich, wie das bei den cMSCs der Fall war (siehe Abbildung 4.1).

Des Weiteren konnte ein Unterschied in der Proliferationsrate der beiden MSC-Linien festgestellt werden. Die sMSCs wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$  ausplattiert und erreichten eine 80-prozentige Konfluenz nach 7–8 Tagen. Die cMSCs hingegen erreichten eine 80-prozentige Konfluenz bereits nach 3–4 Tagen, obwohl sie in einer geringeren Dichte von  $2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ , wie in der Gebrauchsanleitung empfohlen, ausgesät wurden.

#### 4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der MSCs

Die sMSCs wiesen eine positive Expression der Stammzellmarker CD90 ( $94,0 \pm 2,7\%$ ) und CD54 ( $71,7 \pm 3,8\%$ ) auf. Für die hämatologischen Marker CD34 waren sie gänzlich negativ, jedoch für CD45 ( $12,7 \pm 2,2\%$ ) teilweise positiv (siehe Abbildung 4.2).

Die einmalige Messung für die cMSCs zeigte eine positive Expression von CD90 ( $98,5\%$ ) und CD54 ( $96,0\%$ ) sowie eine negative Expression für die hämatologischen Oberflächenantigene CD34 und CD45 (beide  $0,0\%$ , siehe Abbildung 4.3).

#### 4.1.3 Adipozytendifferenzierungsrate der MSCs

Für beide MSC-Linien konnte die Fähigkeit zur Adipozytendifferenzierung mittels Oil-Red-O-Färbung nachgewiesen werden. Nach drei Wochen Kultivierung in Adipozytendifferenzierungsmedium wurden für die sMSCs eine Fettzellrate von  $10,00 \pm 0,93\%$  erreicht. Die cMSCs erreichten eine ungefähr doppelt so hohe Ausbildungsrate an Fettzellen  $21,69 \pm 0,31\%$ . Die unbehandelten Kontrollen zeigten keine spontane Fettzellbildung nach drei Wochen Kultivierung in DMEM (siehe Abbildung 4.4).





Abbildung 4.1: MSCs in Zellkultur. (a) Hellfeldmikroskopie von cMSCs der Passage 6 und (c) sMSCs der Passage 3 bei 10-facher Vergrößerung. (b) Immunfluoreszenzfärbung von cMSCs der Passage 6 und (d) sMSCs der Passage 3 bei 400-facher Vergrößerung. Grün: Stammzellmarker CD90, blau: DAPI-Kernfärbung. Die beschriebenen Unterschiede in Form und Größe zeigten sich besonders deutlich in den Immunfluoreszenzfärbungen. Auch die ausgeprägten Zellausläufer der sMSCs ließen sich gut beobachten, siehe (d).

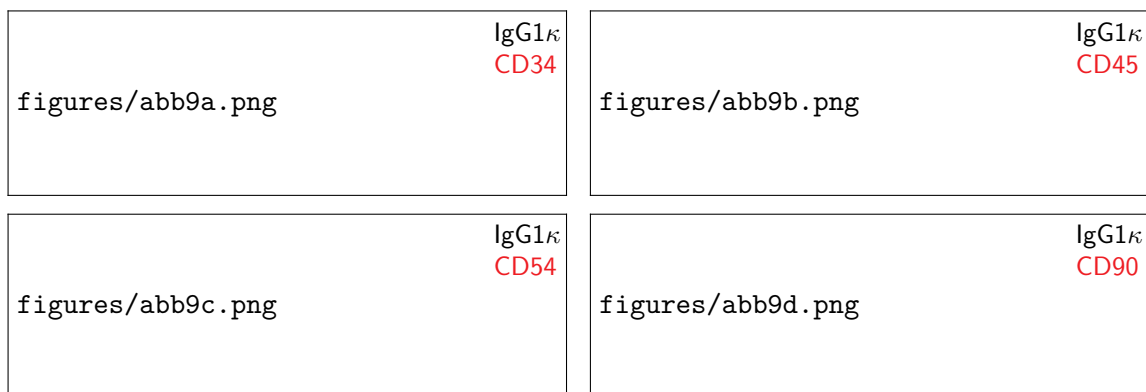


Abbildung 4.2: Durchflusszytometrische Analyse der sMSCs in der Passage 3. x-Achse: FITC-Fluoreszenzintensitäten, y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse (Count). Die schwarze Kurve entspricht der Isotypkontrolle, die rote Kurve dem jeweilig gemessenen Antigen.

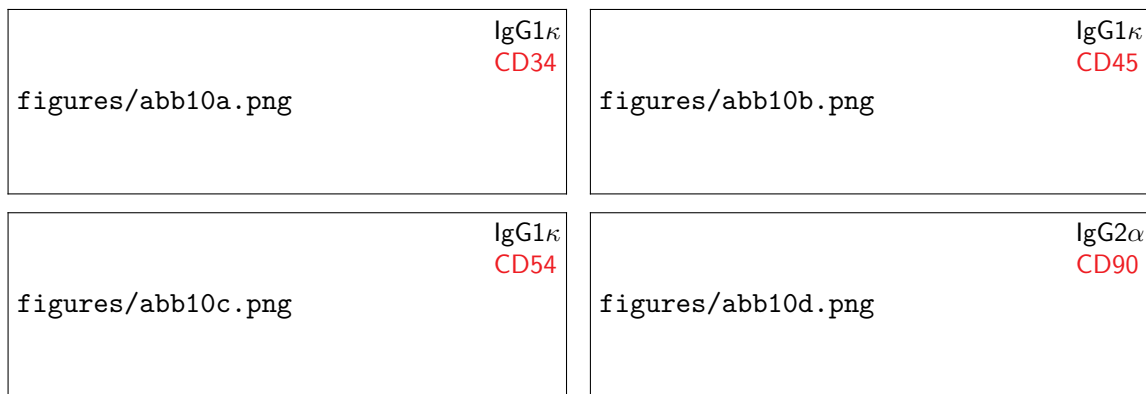


Abbildung 4.3: Durchflusszytometrische Analyse der cMSCs der Passage 6. x-Achse: FITC-Fluoreszenzintensitäten, y-Achse: Anzahl der gemessenen Ereignisse (Count). Die schwarze Kurve entspricht der Isotypkontrolle, die rote Kurve dem jeweilig gemessenen Antigen.

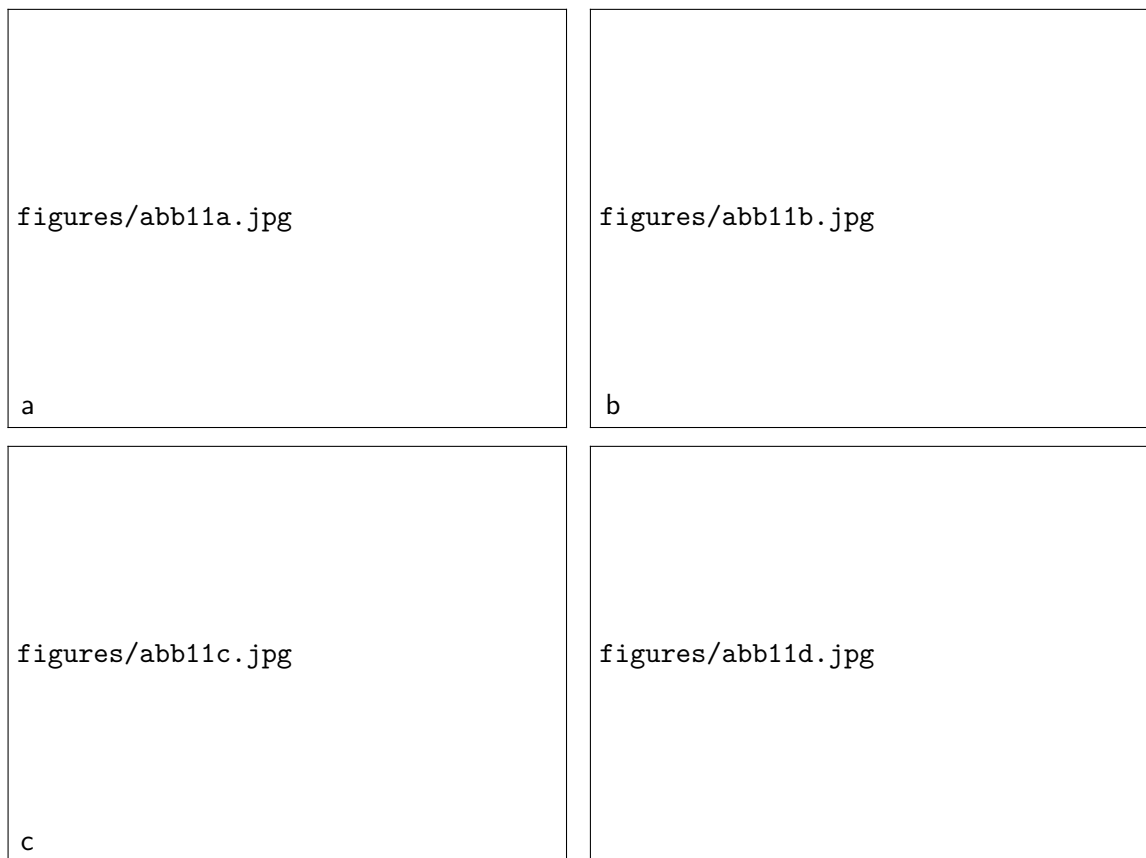
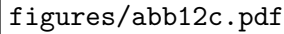


Abbildung 4.4: Oil-Red-O-Färbung der MSCs. Rot: Fettzellen, blau: nicht adipogen differenzierte Zellen. (a) sMSCs der Passage 3 und (b) cMSCs der Passage 6 bei 400-facher Vergrößerung, (a/b) nach Kultivierung in Adipozytendifferenzierungsmedium. (c) sMSCs der Passage 3 und (b) cMSCs der Passage 6 bei 200-facher Vergrößerung, (c/d) nach Kultivierung ohne Adipozytendifferenzierungsmedium.



figures/abb12c.pdf

Abbildung 4.5: Übersicht zu hergestellten EHTs und MSC-ETs.

## 4.2 Vergleich der EHTs und MSC-ETs in vitro und in vivo

### 4.2.1 Übersicht zu hergestellten EHTs und MSC-ETs

In der Summe konnten 12 reguläre EHTs und 13 MSC-ETs, davon 7 cMSC-ETs und 6 sMSC-ETs, hergestellt werden. Nach beendeter Kultivierung wurden die EHTs für die In-vitro-Auswertung direkt fixiert oder für die In-vivo-Auswertung der Implantation zugeführt. Es wurden 6 der 12 regulären EHTs implantiert. Bei den MSC-ETs wurden jeweils 3 der 7 cMSC-ETs und 3 der 6 sMSC-ETs implantiert. Aus einem der cMSC-ETs entwickelte sich nach Implantation ein Sarkom (siehe Abbildung 4.5).

### 4.2.2 Morphologie und Funktion

Nach 14 Tagen Kultivierung inklusive sechs Tagen Elektrostimulation entwickelten die EHTs und MSC-ETs die gleiche Konsistenz und Größe und waren visuell nicht voneinander zu unterscheiden (siehe Abbildung 4.6). Die EHTs zeigten, wie bereits von Nichtitz beschrieben, sichtbare Kontraktionen [Nichtitz 2009]. Hingegen konnten bei den MSC-ETs weder mikroskopisch noch makroskopisch Kontraktionen festgestellt werden.

30 Tage nach Implantation konnten sowohl alle EHTs als auch MSC-ETs durch ihr charakteristisches Aussehen und Lokalisation identifiziert werden. Die blasse Färbung der künstlichen Geweberinge zeigte an, dass diese einen hohen Anteil an Bindegewebe besaßen. Zudem zeigten sie sich gut strukturell und vaskulär zum nativen Herzgewebe integriert. Zu erkennen war dies an zahlreichen Erythrozyten-führenden Gefäßen innerhalb der EHTs und MSC-ETs und an deren lückenlosen Übergang zum Herzgewebe (siehe Abbildung 4.7).

### 4.2.3 Statistischer Vergleich

Nach der abgeschlossenen histologischen Auswertung erfolgte im ersten Schritt die statistische Gegenüberstellung der regulären EHTs mit den MSC-ETs mittels einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse. Es wurde untersucht, ob die Faktoren (1) Zellsorte, (2) In-vitro-/In-vivo-Situation und (3) Abhängigkeit eines nachgewiesenen In-vitro-/In-vivo-Unterschiedes von der Zellsorte, einen statistisch signifikanten Einfluss auf die abhängigen Parameter hatten. Hierzu wurden die abhängigen Parameter einzeln in der gleichen Abfolge analysiert. Zuerst wurde untersucht ob sich statistisch signifikante Unterschiede bei den abhängigen Parametern aufgrund der Zellsorte ergaben: Kardiomyozyten für reguläre EHTs oder



Abbildung 4.6: Fertig kultiviertes EHT. Sterile Aufbewahrung des EHTs in einer Petrischale kurz vor Implantation.

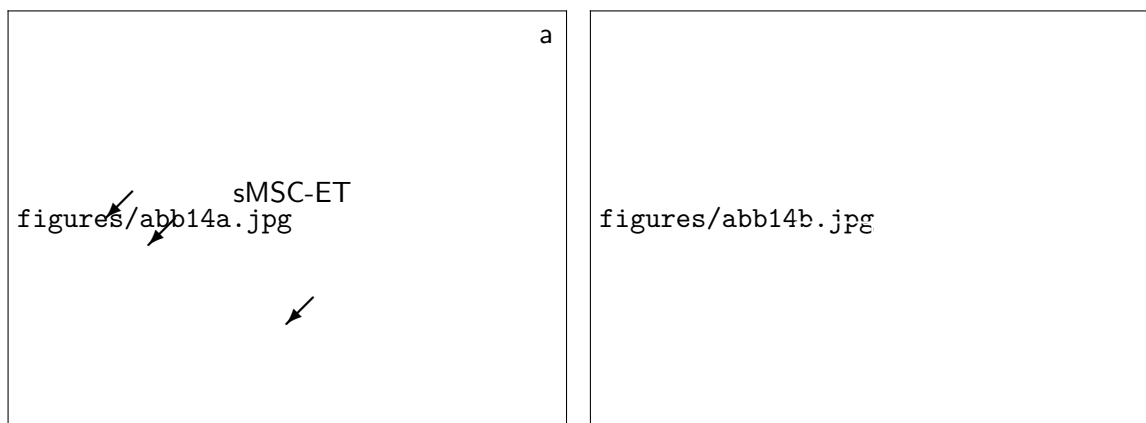


Abbildung 4.7: Azan-novum-Färbung von einem sMSC-ET in vivo. Blau: Kollagen, orange-rötlich: Myozyten, rot: Erythrozyten. (a) Übersichtsaufnahme vom lückenlosen Gewebsübergang von Herzgewebe und MSC-ET-Gewebe bei 50-facher Vergrößerung. Vereinzelt mit größeren Gefäßen im Übergangsbereich (Pfeile). (b) Vergrößerter Ausschnitt aus dem MSC-ET-Gewebe mit Erythrozyten-führenden Gefäßen.

mesenchymale Stammzellen für MSC-ETs. Danach wurde betrachtet, ob erkennbare Unterschiede zwischen In-vivo- und In-vitro-Situation bestanden und wenn dem so war, ob diese wiederum von der Zellsorte abhängig waren (siehe Tabelle 6.1).

Da MSC-ETs sowohl aus sMSCs als auch aus cMSCs bestanden, wurden diese anschließend auf die gleiche Weise gegenübergestellt wie zuvor die EHTs mit den MSC-ETs, um mögliche Abweichungen innerhalb der MSC-ETs erkennen zu können (siehe Tabelle 6.2).

#### 4.2.3.1 Anteil an Kollagen und Myozyten

Um die EHT-Gruppen qualitativ und quantitativ in ihrer Zusammensetzung aus Kollagen und Myozyten beurteilen zu können, wurde die Azan-novum-Färbung nach Geidies eingesetzt.

Im histologischen Bild zeigte sich beim Vergleich der EHTs in vitro ein etwas weniger dichtes Kollagenetz als in vivo (siehe Abbildung 4.8a/b). Gegenteilig dazu verhielt es sich bei den MSC-ETs. In vivo konnten nur wenige Zwischenräume im Kollagengerüst nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.8c); nach Implantation war selbiges jedoch deutlich aufgelockerter (siehe Abbildung 4.8d). Passend zu den Beobachtungen von Nichtitz bezüglich der Myozytenlokalisation zeigte sich auch in dieser Arbeit für alle EHT-Gruppen in vitro, dass die Myozyten überwiegend im äußeren Randbereich der EHTs zu finden waren und sich zumeist längs der Geweboberfläche ausgerichtet hatten (siehe Abbildung 4.8a/c) [Nichtitz 2009].

In der quantitativen Auswertung konnten klare Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich des Kollagenanteils festgestellt werden. So besaßen die EHTs in vitro einen geringeren Kollagenanteil mit 53,5 %; nach Transplantation erhöhte sich dieser Anteil auf 60 %. Für die MSC-ETs konnte ein Anteil von 64 % in vitro gemessen werden, der sich unter In-vivo-Bedingungen allerdings fast halbierte. Statistisch betrachtet war der Kollagenanteil demnach von der Zellsorte und der In-vitro-/In-vivo-Situation signifikant abhängig ( $p < 0,001$ ). Zusätzlich wurde das In-vitro-/In-vivo-Verhalten wiederum von der Zellsorte beeinflusst ( $p < 0,001$ ) (siehe Abbildung 4.9).

Innerhalb der MSC-ET-Gruppen zeigten sich ebenfalls Unterschiede. Für die sMSC-ETs wurde in vitro der höchste Kollagengehalt mit ca. 70 % bestimmt, während dieser in vivo noch 37 % betrug. Äquivalent dazu nahm der Kollagenanteil der cMSC-ETs von in vitro nach in vivo ebenfalls ab. So besaßen diese in vitro fast 65 % und in vivo nur noch 27 % Kollagen bezogen auf das Gesamtgewebe. Damit konnte bewiesen werden, dass der Kollagenanteil signifikant von der Zellsorte ( $p = 0,009$ ) und dem In-vitro-/In-vivo-Zustand ( $p < 0,001$ ) abhängig war (siehe Abbildung 4.10).

Zudem konnte in der quantitativen Auswertung der Azan-Novum-Färbung nach Geidies gezeigt werden, dass die konventionellen EHTs einen deutlich höheren Myozytenanteil besaßen als die MSC-ETs. Vor Implantation wiesen die EHTs einen Myozytenanteil von 5 % an der Gesamtfläche auf, der nach der Implantation auf 3 % sank, wohingegen der Anteil der MSC-ETs nur unter 0,5 % in vivo und in vitro lag. Dieser Umstand wurde signifikant von der Zellsorte beeinflusst ( $p < 0,001$ ), nicht aber von der In-vitro-/In-vivo-Situation (siehe Abbildung 4.11). Der Vergleich der MSC-Gruppen untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede in der Ausbildung der Muskelzellen (siehe Abbildung 4.12).

Dennoch lässt sich grundsätzlich für alle drei Gruppen in vitro und in vivo zusammenfassen, dass Kollagen, im Vergleich zu den Myozyten, der vorherrschende Bestandteil der EHTs war.

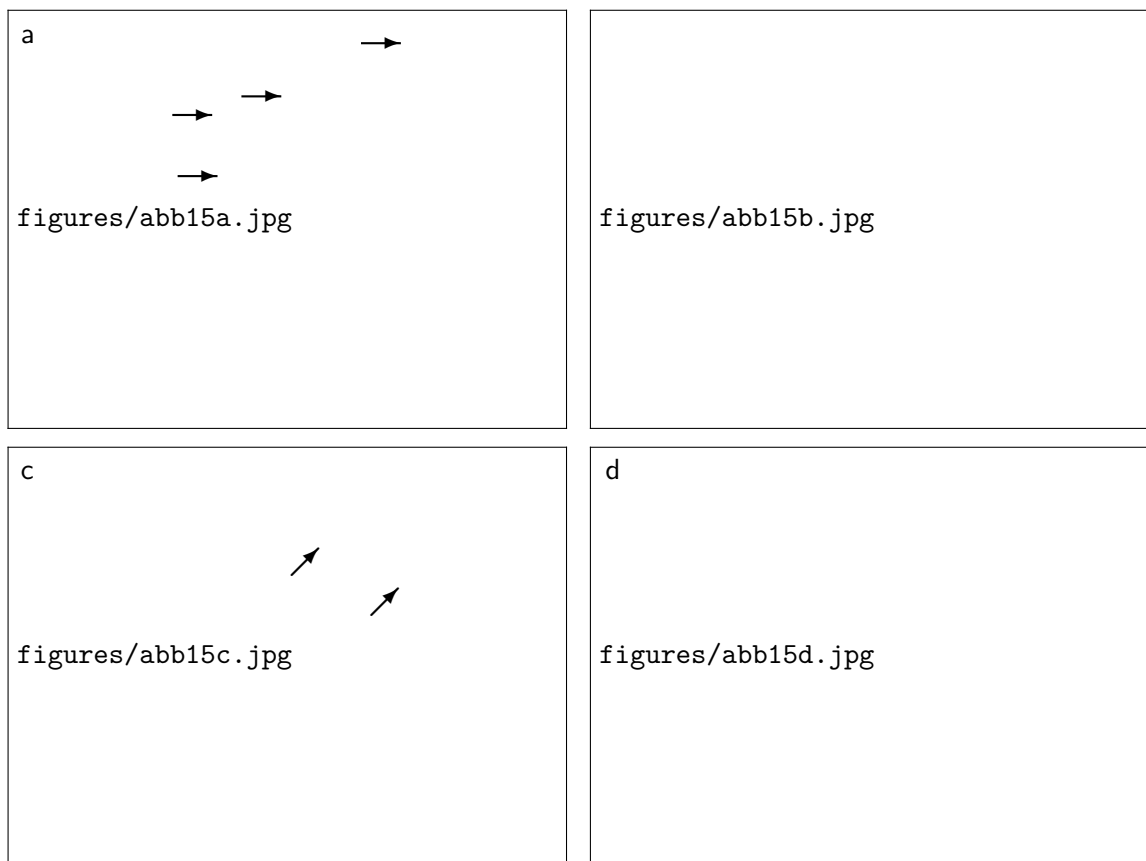


Abbildung 4.8: Azan-novum-Färbung von MSC-ETs in vitro und in vivo. Orange-rötlich: Myozyten, blau: Kollagen. (a) EHT in vitro und (c) sMSC-ET in vitro zeigen Myozytenanreicherung im äußeren Randbereich (Pfeile). (b) EHT in vivo und (d) sMSC-ET in vivo. Leichte Kollagenverdichtung von EHT in vitro zu EHT in vivo. Deutliche Kollagenauflöckerung von sMSC-ET in vitro zu sMSC-ET in vivo. 200-fache Vergrößerung.

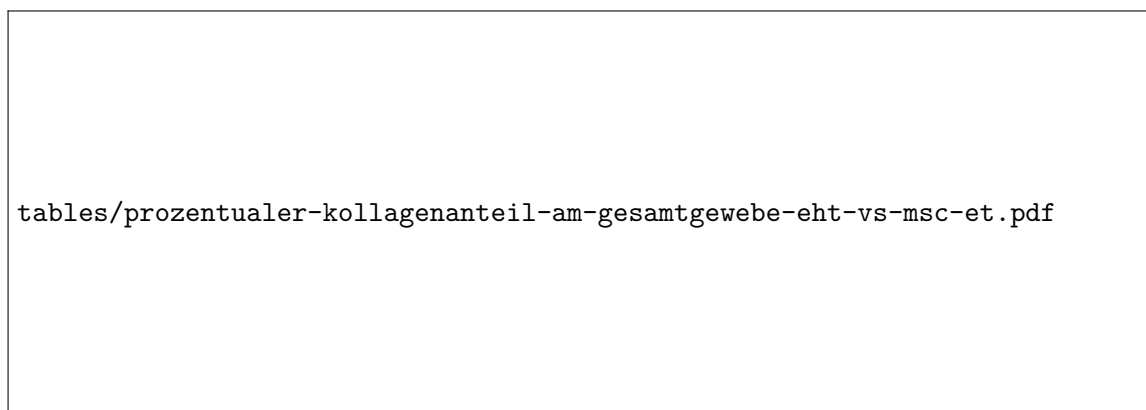


Abbildung 4.9: Prozentualer Kollagenanteil am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET.

tables/prozentualer-kollagenanteil-am-gesamtgewebe-sm-sc-et-vs-cm-sc-et.pdf

Abbildung 4.10: Prozentualer Kollagenanteil am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET.

tables/prozentualer-myozytenanteil-am-gesamtgewebe-eh-t-vs-m-sc-et.pdf

Abbildung 4.11: Prozentualer Myozytenanteil am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET.

tables/prozentualer-myozytenanteil-am-gesamtgewebe-sm-sc-et-vs-cm-sc-et.pdf

Abbildung 4.12: Prozentualer Myozytenanteil am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET.



Abbildung 4.13: Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines EHTs in vitro. Rot: Troponin I, grün: Cx43, blau: DAPI. Zu erkennen sind quergestreifte, Troponin-I-positive Kardiomyozyten (Vergrößerungskästchen) sowie eine hauptsächlich membranär ausgerichtete Cx43-Expression (Pfeile). 1000-fache Vergrößerung.

#### 4.2.3.2 Expression von Troponin I und Cx43

Troponin I gehört zu einem Proteinkomplex, der die Kalzium-abhängige Interaktion zwischen Aktin und Myosin im quergestreiften Muskel reguliert. Kardiales und skelettmuskuläres Troponin I sind unterschiedliche Genprodukte mit einzigartigen Aminosäuresequenzen. Deshalb gilt Troponin I als klassischer Marker für Kardiomyozyten [Adams et al. 1993].

Connexine gehören zu einer Familie von Transmembranproteinen, die Gap Junctions bilden. Ein Gap-Junction-Kanal wird von zwei benachbarten Zellen gebildet, wobei jede dieser Zellen ein Connexon, bestehend aus sechs zusammengelagerten Connexinen, bereitstellt [Kumar und Gilula 1996]. Über diese Verbindung wird der Austausch von Molekülen zwischen Zellen ermöglicht. Gap-Junction-Proteine stellen folglich eine wesentliche Voraussetzung für direkte interzelluläre Kommunikation dar. Cx43 zählt zu den am weitesten verbreiteten Gap-Junction-Proteinen [Shore et al. 2001]. So ist es auch das am stärksten exprimierte Connexin im Herzmuskel, weswegen es zusammen mit Troponin I zur Identifizierung von Kardiomyozyten in den EHT-Gruppen verwendet wurde.

Erwartungsgemäß konnten in allen konventionellen EHTs vor und nach Transplantation Zellen nachgewiesen werden, die sowohl Troponin I in quergestreifter Form als auch Cx43 aufwiesen (siehe Abbildungen 4.13 und 4.14). Für MSC-ETs in vitro und in vivo konnte keine Querstreifung der Myozyten durch Troponin I nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.15). Entsprechend waren die als Myozyten identifizierten Zellen in den MSC-ETs (siehe Abschnitt 4.2.3.1) nicht kardial differenziert.





Abbildung 4.14: Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines EHTs in vivo. Rot: Troponin I, grün: Cx43, blau: DAPI. Zu erkennen sind quergestreifte, Troponin-I-positive Kardiomyozyten (Vergrößerungskästchen) sowie eine hauptsächlich membranär ausgerichtete Cx43-Expression (Pfeile). 400-fache Vergrößerung.

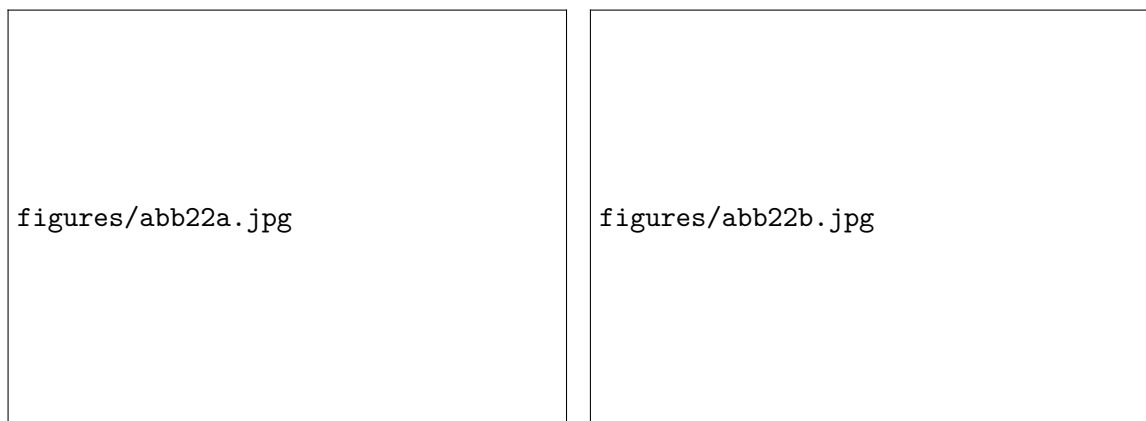


Abbildung 4.15: Immunfluoreszenzdreifachfärbung von MSC-ETs in vitro und in vivo. Rot: Troponin I, grün: Cx43, blau: DAPI. (a) cMSC-ET in vitro bei 1000-facher Vergrößerung, (b) cMSC-ET in vivo bei 400-facher Vergrößerung. In beiden Abbildungen sind keine Querstreifungen durch Troponin I erkennbar. Allerdings finden sich viele Cx43-exprimierende Zellen, wobei Cx43 eher ungerichtet im gesamten Zytoplasma lokalisiert ist. Die Abbildungen waren ebenso repräsentativ für sMSC-ETs.

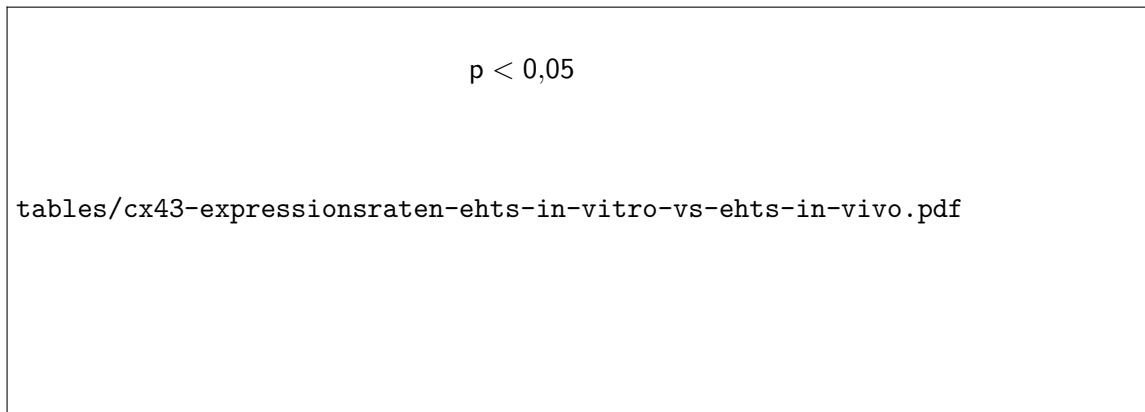


Abbildung 4.16: Cx43-Expressionsraten: EHTs in vitro versus EHTs in vivo.

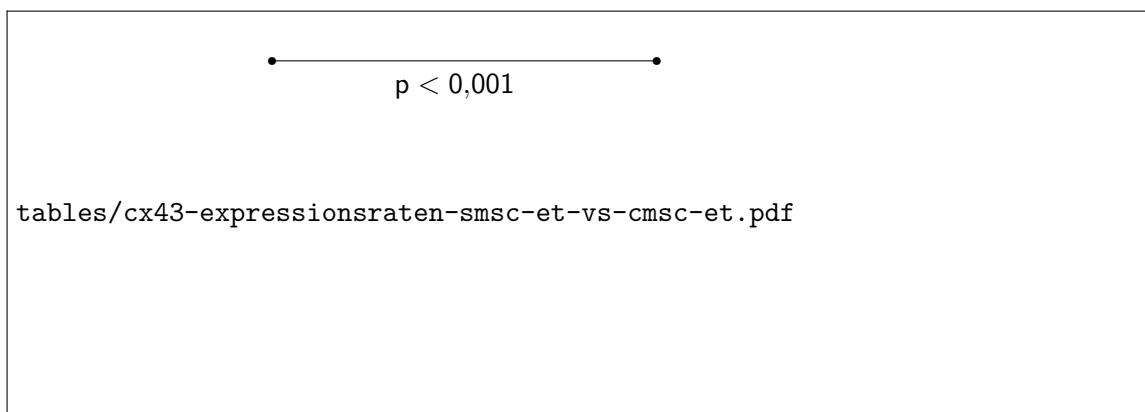


Abbildung 4.17: Cx43-Expressionsraten: sMSC-ET versus cMSC-ET.

Interessanterweise fanden wir trotz der fehlenden kardiomyozytären Differenzierung in allen MSC-ETs hohe Cx43-Expressionsraten, wenngleich sich die Verteilung des Cx43 qualitativ zwischen EHTs und MSC-ETs unterschied. Während sich Cx43 in den Zellen der EHTs hauptsächlich membranär konzentrierte (siehe Abbildungen 4.13 und 4.14), lag selbiges in MSC-ETs eher diffus im gesamten Zytoplasma vor (siehe Abbildung 4.15).

Um auch eine quantitative Aussage treffen zu können, wurden die Cx43-Expressionsraten der EHTs sowie der sMSC-ETs und der cMSC-ETs in vitro und in vivo gegenübergestellt. Die Cx43-Expressionsrate wurde als prozentualer Anteil an Cx43-exprimierenden Zellen bezogen auf die Gesamtanzahl aller Zellen definiert. Es zeigte sich, dass die Zellen der EHTs in vitro zu 54,8 % Cx43 exprimierten. Nach Transplantation stieg die Expression signifikant auf 77,3 % ( $p < 0,05$ ) an (siehe Abbildung 4.16). Vor Transplantation wurde für sMSC-ETs die geringste Cx43-Expression mit 38 % ermittelt; die für cMSC-ETs in vitro lag dagegen signifikant höher bei 74 % ( $p < 0,001$ ). Nach Implantation näherten sich beide Expressionsraten jedoch wieder an, da für die Zellen der sMSC-ETs die Cx43-Rate auf 57 % stieg und für die Zellen der cMSC-ETs auf 50,5 % sank (siehe Abbildung 4.17)

#### 4.2.3.3 Ausbildung von elastischen Fasern

Um eine differenziertere Aussage über die extrazelluläre Matrix der EHTs treffen zu können, wurden diese mit der Elastica-van-Gieson-Färbung behandelt. Dabei zeigte sich, dass keine der EHT-Gruppen elastische Fasern vor Transplantation aufwiesen. Jedoch synthetisierten

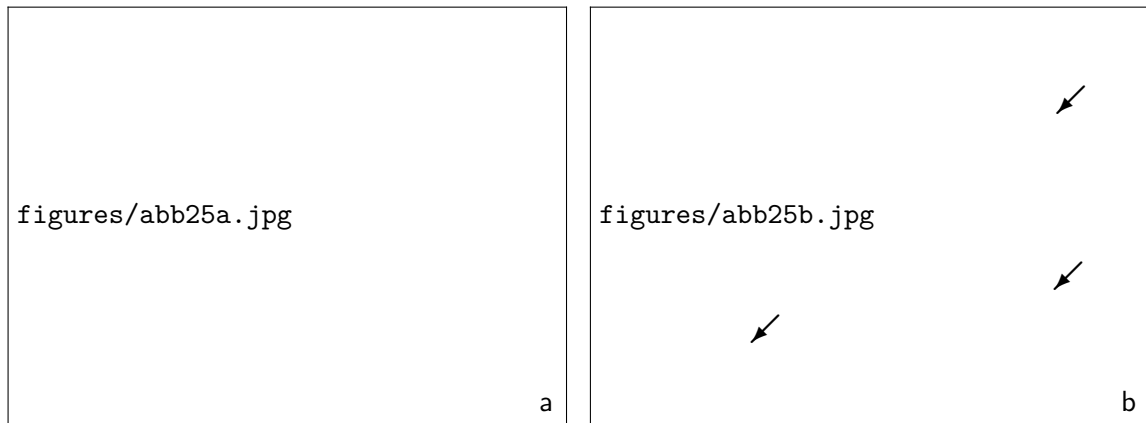


Abbildung 4.18: Elastica-van-Gieson-Färbung von sMSC-ET in vitro und in vivo. Dunkelviolet: elastische Fasern. (a) sMSC-ETs in vitro ohne erkennbare elastische Fasern, (b) sMSC-ETs in vivo mit diffus verteilten, einzeln oder gebündelt vorliegenden elastischen Fasern (Pfeile). 200-fache Vergrößerung. Die Abbildungen der sMSC-ET-Gruppe waren repräsentativ für alle Gruppen.

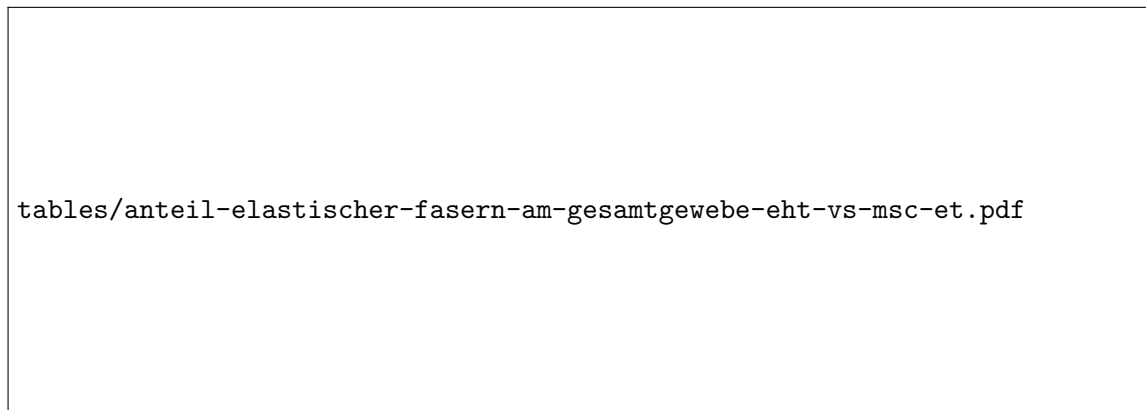


Abbildung 4.19: Anteil elastischer Fasern am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET.

alle EHT-Gruppen elastische Fasern de novo nach Transplantation. Qualitativ waren die elastischen Fasern diffus verteilt, zumeist als einzelne dünne Fasern aber auch selten als verdichtete Bündel. Die Ausrichtung der elastischen Fasern schien eher beliebig. So richteten sie sich mal nach den elongierten Zellen und dann wieder quer zum Gewebeverlauf aus (siehe Abbildung 4.18).

In vivo bildeten die konventionellen EHTs mit 3,8 % mehr elastische Fasern aus als die MSC-ETs mit 1,5 %. Dieser Effekt war sowohl signifikant abhängig von der Zellsorte als auch vom In-vitro-/In-vivo-Zustand ( $p < 0,001$ ). Der Unterschied zwischen in vitro und in vivo war wiederum signifikant von der Zellsorte abhängig ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildung 4.19).

Bei der genauen Analyse der MSC-ETs untereinander konnten ebenfalls Differenzen festgestellt werden. In vivo entwickelten die sMSC-ETs 1,9 % elastische Fasern und die cMSC-ETs nur etwa halb so viel mit 0,9 %. Wie bereits im vorangegangenen Vergleich, war dies signifikant von der Zellsorte und von der In-vitro-/In-vivo-Konstellation abhängig ( $p < 0,001$ ). Auch hier war die Veränderung zwischen in vitro und in vivo signifikant abhängig von der Zellsorte ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildung 4.20).

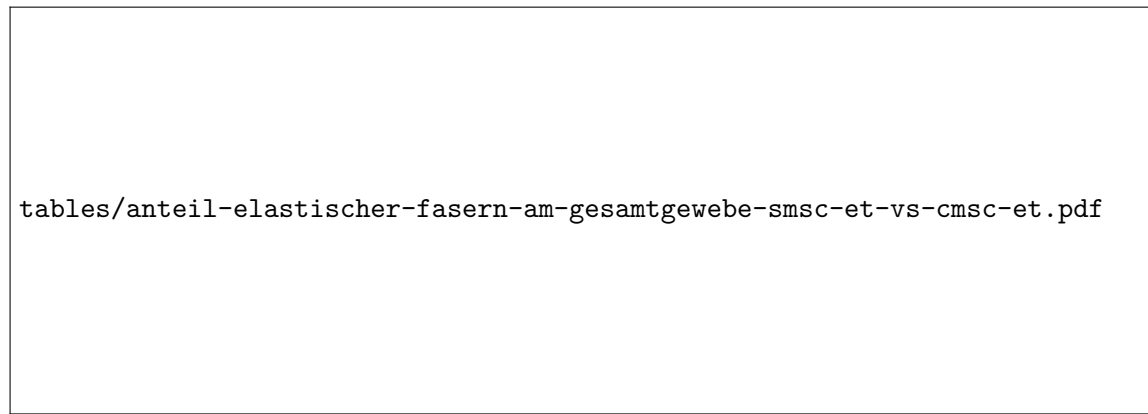


Abbildung 4.20: Anteil elastischer Fasern am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET.

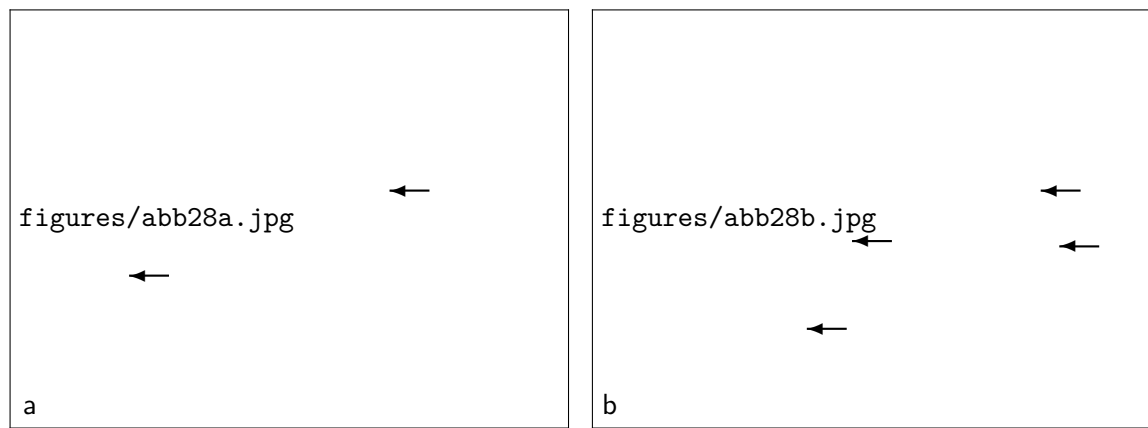


Abbildung 4.21: Entwicklung der Gefäßstrukturen von in vitro nach in vivo. Immunhistochemische Von-Willebrand-Faktor-Färbung. Rot: Von-Willebrand-Faktor-positive Gefäßstrukturen. (a) EHT in vitro mit vereinzelt runden Mikrogefäßen (Pfeile). (b) EHT in vivo mit deutlich größeren und formverschiedenen Gefäßen (Pfeile). 200-fache Vergrößerung. Die Abbildungen der EHT-Gruppe waren repräsentativ für alle Gruppen.

#### 4.2.3.4 Ausbildung von Gefäßen

Da Gefäße eine zentrale Rolle in der Gewebeversorgung spielen, wurden die EHTs auf deren Anwesenheit untersucht. Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises des Glykoproteins Von-Willebrand-Faktor, der von Endothelzellen sowohl synthetisiert als auch exprimiert wird, gelang die Sichtbarmachung von Gefäßen.

Alle EHT-Gruppen waren in der Lage bereits unter In-vitro-Bedingungen vereinzelt Mikrogefäße auszubilden. Qualitativ betrachtet kamen nach der Implantation, unabhängig von der EHT-Gruppe, deutlich größere Gefäße hinzu (siehe Abbildung 4.21).

Bei der qualitativen Auswertung der Gefäßwände wiesen EHTs und MSC-ETs wesentliche Übereinstimmungen auf. Beide Gruppen verfügten unter Kulturbedingungen über Gefäße mit mittleren Wanddicken von 2,4–2,5 µm und zeigten in vivo eine mittlere Verbreiterung auf 4,4–4,5 µm. Damit zeigte sich ausschließlich eine signifikante Abhängigkeit der Wanddicke vom In-vitro-/In-vivo-Status ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildung 4.22).

tables/mittlere-wanddicke-der-gefaesze-in-mum-eh-ht-vs-msc-et.pdf

Abbildung 4.22: Mittlere Wanddicke der Gefäße in  $\mu\text{m}$ : EHT versus MSC-ET.

tables/mittlere-wanddicke-der-gefaesze-in-mum-sm-sc-et-vs-cm-sc-et.pdf

Abbildung 4.23: Mittlere Wanddicke der Gefäße in  $\mu\text{m}$ : sMSC-ET versus cMSC-ET.

Erstaunlicherweise gab es innerhalb der MSC-ETs nennenswerte Differenzen bezüglich der Wanddicken. In vitro betrug diese für sMSC-ETs durchschnittlich  $2,1 \mu\text{m}$  und für cMSC-ETs  $2,7 \mu\text{m}$ . Diese Tendenz setzte sich auch nach Transplantation fort. Für sMSC-ETs konnte eine Wanddicke von  $4,1 \mu\text{m}$  und für cMSC-ETs von  $4,9 \mu\text{m}$  ermittelt werden. Somit stellte sich eine signifikante Abhängigkeit bezogen auf die Zellsorte heraus ( $p = 0,008$ ) und ebenso auf den Parameter in vitro/in vivo ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildungen 4.23 und 4.24).

Die Gesamtfläche der EHTs in vitro wurde zu  $0,05 \%$  von Gefäßen eingenommen und in vivo bereits zu etwa  $3 \%$ . Die MSC-ETs verhielten sich ähnlich; so wiesen sie in vitro  $0,13 \%$  Gefäßfläche und in vivo mit  $2,6 \%$  ein Vielfaches mehr auf. Das Verhältnis der Gefäßfläche zur Gesamtfläche war signifikant abhängig vom In-vitro-/In-vivo-Zustand ( $p < 0,001$ ), nicht aber von der Zellsorte (siehe Abbildung 4.25).

Der Vergleich der sMSC-ETs und cMSC-ETs zeigte, dass cMSC-ETs sowohl in vitro als auch in vivo geringfügig mehr prozentuale Gefäßfläche aufwiesen. Allerdings war dies nicht signifikant abhängig von der Zellsorte, sondern ausschließlich davon, ob das Verhältnis vor oder nach Transplantation gemessen wurde ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildung 4.26).

Für eine präzisere Quantifizierung wurde die Gefäßanzahl je  $\text{mm}^2$  bestimmt. Entsprechend den Ergebnissen zur anteiligen Gefäßfläche kam es nach Transplantation zu einer erheblichen Zunahme der Gefäßdichte in allen EHT-Gruppen. Konventionelle EHTs entwickelten unter Kulturbedingungen 3 Gefäße je  $\text{mm}^2$  und nach Transplantation 57 Gefäße je  $\text{mm}^2$ . MSC-ETs wiesen in vitro bereits fast 13 Gefäße je  $\text{mm}^2$  auf, dagegen in vivo nur 45, womit sie niedriger lagen als die EHT-Gruppe.

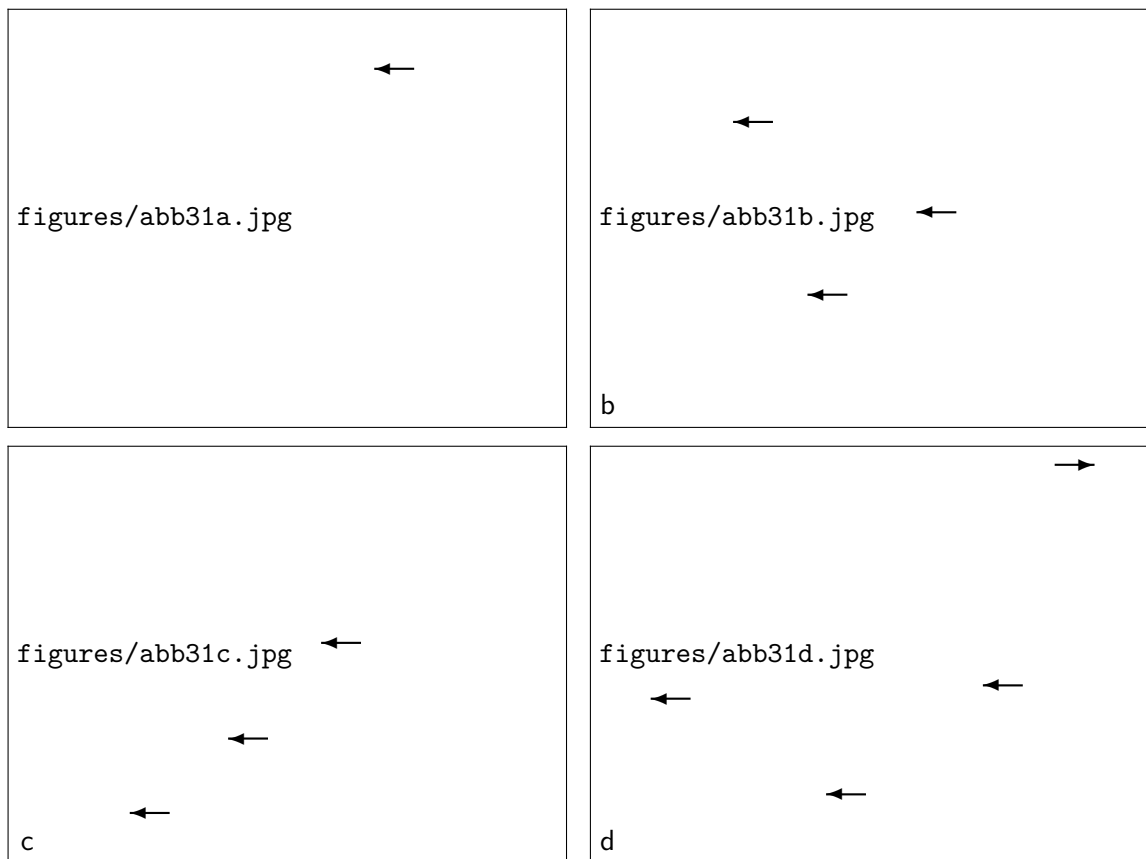


Abbildung 4.24: Ausbildung der Gefäßstrukturen: sMSC-ETs versus cMSC-ETs. Immunhistochemische Von-Willebrand-Faktor-Färbung. Rot: Von-Willebrand-Faktor-positive Gefäßstrukturen. (a) sMSC-ET in vitro, (b) sMSC-ET in vivo, (c) cMSC-ET in vitro und (d) cMSC-ET in vivo. Sowohl in vitro als auch in vivo weisen cMSC-ETs die dickeren Gefäßwände als sMSC-ETs auf (Pfeile). 200-fache Vergrößerung.

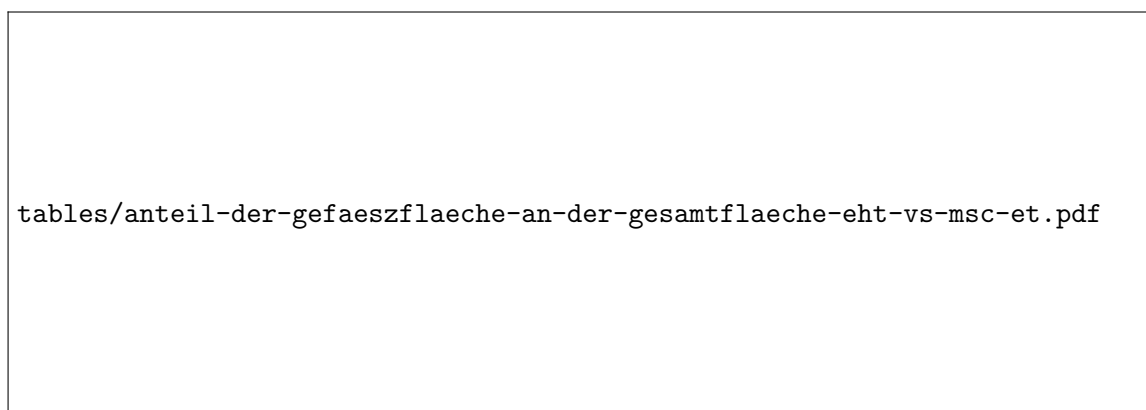


Abbildung 4.25: Anteil der Gefäßfläche an der Gesamtfläche: EHT versus MSC-ET.

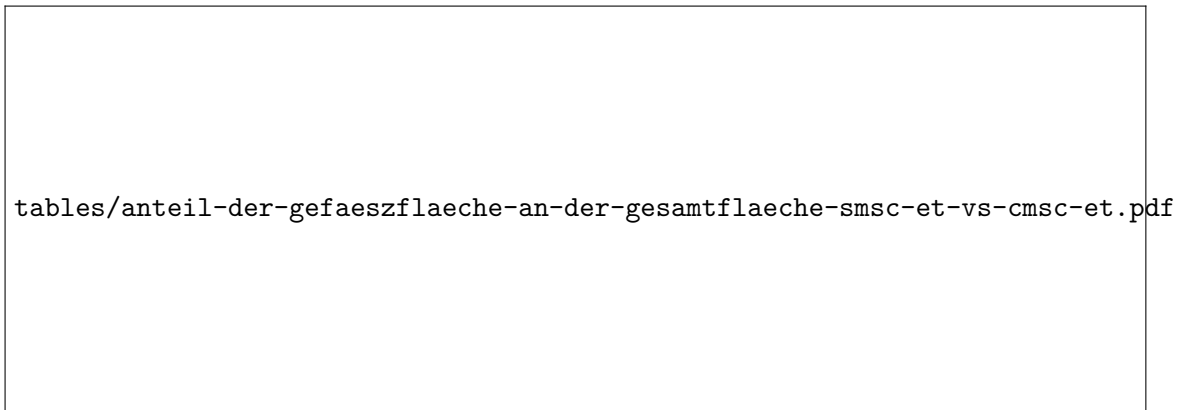


Abbildung 4.26: Anteil der Gefäßfläche an der Gesamtfläche: sMSC-ET versus cMSC-ET.

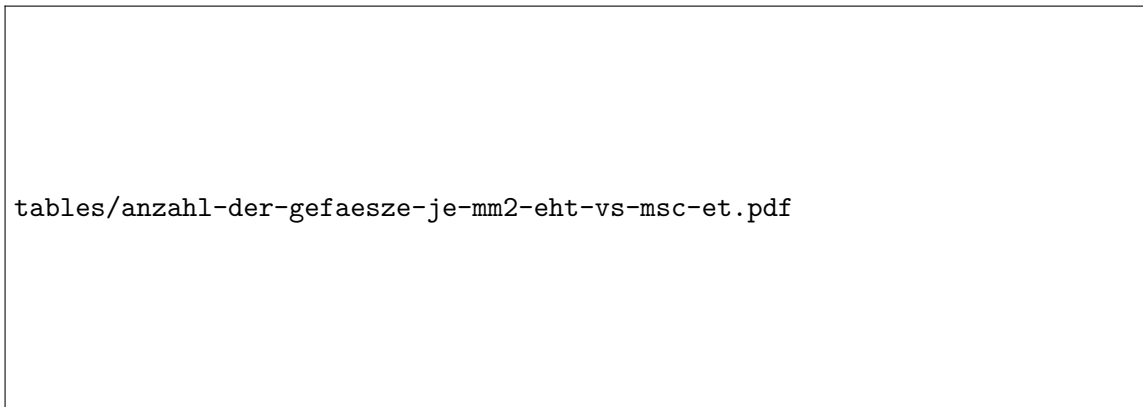


Abbildung 4.27: Anzahl der Gefäße je mm<sup>2</sup>: EHT versus MSC-ET.

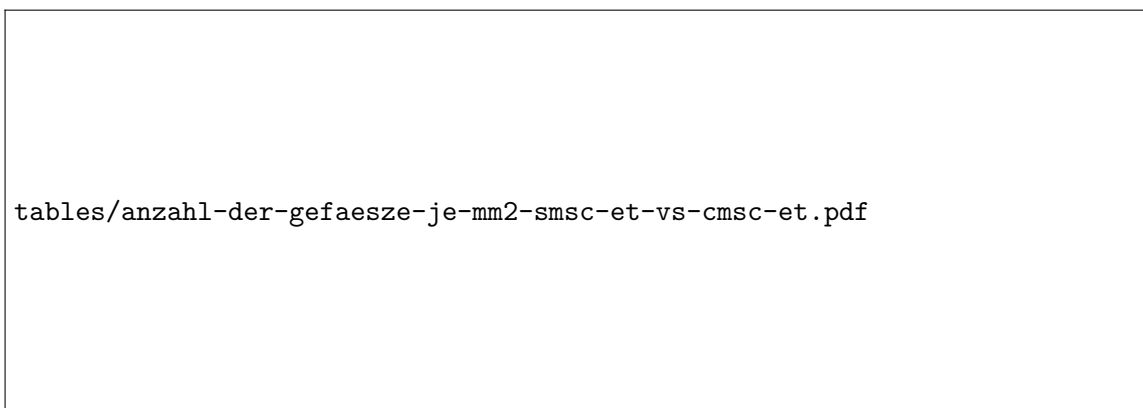


Abbildung 4.28: Anzahl der Gefäße je mm<sup>2</sup>: sMSC-ET versus cMSC-ET.

tables/mittlerer-gefaeszperimeter-in-mum-eh-t-vs-msc-et.pdf

Abbildung 4.29: Mittlerer Gefäßperimeter in  $\mu\text{m}$ : EHT versus MSC-ET.

tables/mittlerer-gefaeszperimeter-in-mum-sm-sc-et-vs-cm-sc-et.pdf

Abbildung 4.30: Mittlerer Gefäßperimeter in  $\mu\text{m}$ : sMSC-ET versus cMSC-ET.

Grundsätzlich hatte die Zellsorte keinen statistisch belegbaren Einfluss auf die Gefäßdichte ( $p = 0,78$ ). Die Gefäßanzahl je  $\text{mm}^2$  war jedoch signifikant abhängig vom In-vitro-/In-vivo-Status ( $p < 0,001$ ) und dieser wiederum wurde ebenfalls signifikant von der Zellsorte beeinflusst ( $p = 0,005$ ; siehe Abbildung 4.27).

Die Gegenüberstellung der MSC-ETs konnte interessante Unterschiede in der Vaskularisierung aufdecken. In vitro wurden für cMSC-ETs 6- bis 7-mal mehr Gefäße ausgezählt als für sMSC-ETs. Hingegen brachten nach Transplantation sMSC-ETs 49 und cMSC-ETs nur 39 Gefäße je  $\text{mm}^2$  hervor. Die Gefäßdichte zeigte sich unbeeinflusst von der Zellsorte ( $p = 0,701$ ). Wie jedoch bereits im obigen Vergleich gezeigt, hatte auch hier der In-vitro-/In-vivo-Unterschied einen signifikanten Einfluss auf die Gefäßanzahl je  $\text{mm}^2$  ( $p < 0,001$ ) und auch der Anstieg der Gefäßanzahl von in vitro nach in vivo war signifikant abhängig von der Zellsorte ( $p = 0,002$ ; siehe Abbildung 4.28).

Beim Vergleich des Gefäßperimeters fiel zunächst auf, dass die EHTs in vitro mit  $51 \mu\text{m}$  im Mittel über größere Gefäße verfügten als die MSC-ETs in vitro mit  $37 \mu\text{m}$ . Nach Implantation maßen die Gefäßumfänge beider Gruppen knapp über  $100 \mu\text{m}$ . Statistisch konnte dennoch nur eine signifikante Abhängigkeit zur In-vitro-/In-vivo-Situation ( $p < 0,001$ ) und nicht zur Zellsorte hergestellt werden ( $p = 0,87$ ; siehe Abbildung 4.29). Die MSC-Gruppen verhielten sich indessen gleich bezüglich des mittleren Gefäßperimeters und waren nur signifikant abhängig von der In-vitro-/In-vivo-Veränderung ( $p = 0,002$ ; siehe Abbildung 4.30).



tables/gefaeszanteil-der-klasse-klein-eh-vc-msc-et.pdf

Abbildung 4.31: Gefäßanteil der Klasse *Klein*: EHT versus MSC-ET.

tables/gefaeszanteil-der-klasse-klein-sm-sc-et-vs-cmsc-et.pdf

Abbildung 4.32: Gefäßanteil der Klasse *Klein*: sMSC-ET versus cMSC-ET.

Um die Verteilung und Entwicklung der Gefäßgrößen in den einzelnen Gruppen vor und nach Implantation besser beschreiben zu können, wurden die Gefäße in drei Klassen unterteilt:

- Klein*    Gefäßperimeter von 0–50  $\mu\text{m}$
- Mittel*    Gefäßperimeter von >50–100  $\mu\text{m}$
- Groß*    Gefäßperimeter von >100  $\mu\text{m}$

Die Gefäßklasse *Klein* war von allen Gruppen prozentual am stärksten vertreten. Jedoch hatten die MSC-ETs in vitro mit über 80 % einen größeren Anteil an kleinen Gefäßen als die EHTs mit 56 %. Nach Implantation nahm dieser Anteil für beide Gruppen ab und näherte sich gegenseitig an: MSC-ETs in vivo mit 50 % und EHTs in vivo mit 41 %. Als einzigen signifikanten Einflussfaktor stellte sich die In-vitro-/In-vivo-Situation heraus ( $p = 0,025$ ; siehe Abbildung 4.31). Unter den MSC-ETs konnten für die Gefäßklasse *Klein* keine wesentlichen Unterschiede ermittelt werden. Auch hier übte lediglich die In-vitro-/In-vivo-Veränderung einen signifikanten Einfluss aus ( $p = 0,024$ ; siehe Abbildung 4.32).

Entsprechend den Vorergebnissen des mittleren Gefäßperimeters war die EHT-Gruppe in vitro in der Gefäßklasse *Mittel* mit 41 % besser vertreten als die MSC-ETs mit 16 %. In vivo fiel der Anteil der mittelgroßen Gefäße in den EHTs auf 31 % und in den MSC-ETs stieg dieser auf 23 % an (siehe Abbildung 4.33). Für die Gefäßklasse *Mittel* konnten trotz der Unterschiede keine Einflussfaktoren statistisch nachgewiesen werden. Beim Vergleich der MSC-ETs war die Gefäßklasse *Mittel* sowohl vor als auch nach der Implantation ähnlich vertreten (siehe Abbildung 4.34).

tables/gefaeszanteil-der-klasse-mittel-eh-t-vs-msc-et.pdf

Abbildung 4.33: Gefäßanteil der Klasse *Mittel*: EHT versus MSC-ET.

tables/gefaeszanteil-der-klasse-mittel-sm-sc-et-vs-cmsc-et.pdf

Abbildung 4.34: Gefäßanteil der Klasse *Mittel*: sMSC-ET versus cMSC-ET.

Anders verhielt es sich in der Gefäßklasse *Groß*. Während vor Implantation praktisch keine Gefäße mit einem Perimeter  $>100\text{ }\mu\text{m}$  aufzufinden waren, so konnte nach Implantation sowohl für EHTs als auch für MSC-ETs ein Anteil von 28 % ermittelt werden. Damit war der Anteil der Gefäßklasse *Groß* ausschließlich von der In-vitro-/In-vivo-Situation abhängig ( $p < 0,001$ ; siehe Abbildung 4.35). Die cMSC-ETs entwickelten jedoch in vivo mit 34 % einen höheren Anteil an großen Gefäßen als die sMSC-ETs mit 24 %. Dennoch hatte auch in diesem Vergleich nur die Entwicklung von in vitro nach in vivo einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,001$ ) und nicht die Zellsorte (siehe Abbildung 4.36).

tables/gefaeszanteil-der-klasse-grosz-eh-t-vs-msc-et.pdf

Abbildung 4.35: Gefäßanteil der Klasse *Groß*: EHT versus MSC-ET.

tables/gefaeszanteil-der-klasse-grosz-sm-sc-et-vs-cm-sc-et.pdf

Abbildung 4.36: Gefäßanteil der Klasse *Groß*: sMSC-ET versus cMSC-ET.

#### 4.2.3.5 CD90-Expression in sMSC-ETs und cMSC-ETs

Bevor die mesenchymalen Stammzellen in die Ringe gelangten, wurden ihre Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie gemessen. Sowohl die sMSCs als auch die cMSCs hatten präimplantativ eine Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers CD90 von deutlich über 90 %. Um eventuelle Differenzierungsvorgänge der MSCs in den EHTs festzustellen, wurden die sMSC-ETs und cMSC-ETs auf die CD90-Expression mittels immunhistochemischer Färbungen getestet.

Dabei ließ sich feststellen, dass die cMSC-ETs in vitro mit 77 % eine signifikant höhere CD90-Expressionsrate aufwiesen als die sMSC-ETs mit 52 % ( $p < 0,05$ ). Nach Implantation fielen bei beiden Gruppen die Expressionsraten auf ungefähr 16 % ab (siehe Abbildung 4.37).

• ————— •  
 $p < 0,05$

tables/cd90-expressionrate-sm-sc-ets-vs-cm-sc-ets.pdf

Abbildung 4.37: CD90-Expressionsrate: sMSC-ETs versus cMSC-ETs.

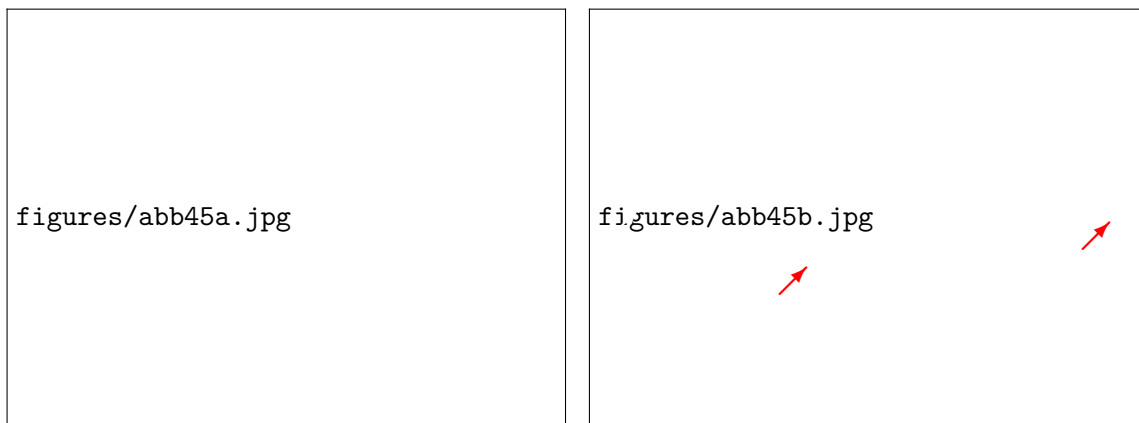


Abbildung 4.38: Tumor makroskopisch. (a) Explantiertes Rattenherz, vollständig von einem Tumor umschlossen. (b) Aufgeschnittenes explantiertes Rattenherz mit bräunlichem Herzgewebe (rote Pfeile) und weiß-gräulichem Tumorgewebe (weiße Pfeile).

### 4.3 Entwicklung eines Tumors nach cMSC-ET-Transplantation

Interessanterweise entwickelte eine der drei cMSC-ET-transplantierten Ratten ein Malignom, welches das Herz komplett umgab und fast den gesamten Thorax ausfüllte. Dieser Tumor wies unter anderem eine bemerkenswerte Expression und Verteilung von Gap-Junction-Proteinen auf, die in Abschnitt 4.3.6 im Detail beschrieben wird. Ähnliche Tumormformationen wurden in keiner der anderen EHT-transplantierten Ratten beobachtet.

#### 4.3.1 Makroskopisch morphologische Beschreibung des Tumors

Der Tumor maß an der schmalsten Stelle 3,28 mm und an der dicksten 12,39 mm. Im Vergleich dazu wies das Rattenherz im größten Transversaldurchmesser 9,03 mm und im Longitudinaldurchmesser 13,48 mm auf. Der solide, derbe zu tastende Tumor war gut begrenzt und von knotiger Struktur. Die Schnittflächen waren weiß-gräulich und zeigten viele Blutungs- und Nekroseareale (siehe Abbildung 4.38). Die makroskopischen Beobachtungen waren gut mit der typischen Beschreibung eines Sarkoms vereinbar [Fletcher 1992].

#### 4.3.2 Pathologische Beschreibung des Tumors

Das cMSC-ET wurde, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, um das Rattenherz transplantiert. Bei Herzentnahme umschloss der Tumor das gesamte Herz (siehe Abbildung 4.38). Histologisch erinnerte die äußere Oberfläche des Malignoms an EHT-Gewebe, zeigte sich jedoch nach innen in Richtung Herzgewebe zunehmend unspezifisch (siehe Abbildung 4.39). Außerdem konnten mehrere Infiltrationen des Herzens durch tumoröses Gewebe gefunden werden (siehe Abbildungen 4.40 und 4.41). Somit konnte von einer Wachstumsrichtung des Malignoms von außen nach innen in Richtung des Herzgewebes mit infiltrierendem Wachstum ausgegangen werden. Zusammengefasst sprachen die Lokalisation und die Wachstumsrichtung des Tumors dafür, dass selbiger vom transplantierten cMSC-ET entstammte.

Das histologische Bild zeigte eng beieinander liegende Zellen und spärlich ausgebildetes Kollagen. Die Zellen wiesen sowohl atypische Nuklei als auch atypisches Zytoplasma auf und die Kern-Plasma-Relation war zugunsten des Kerns verschoben. Die pleomorphen Zellen waren von unterschiedlicher Größe und deren Form differierte von plump-oval über abgerundet bis hin zu spindelförmig. Während in manchen Zellkernen Nukleoli nachgewiesen

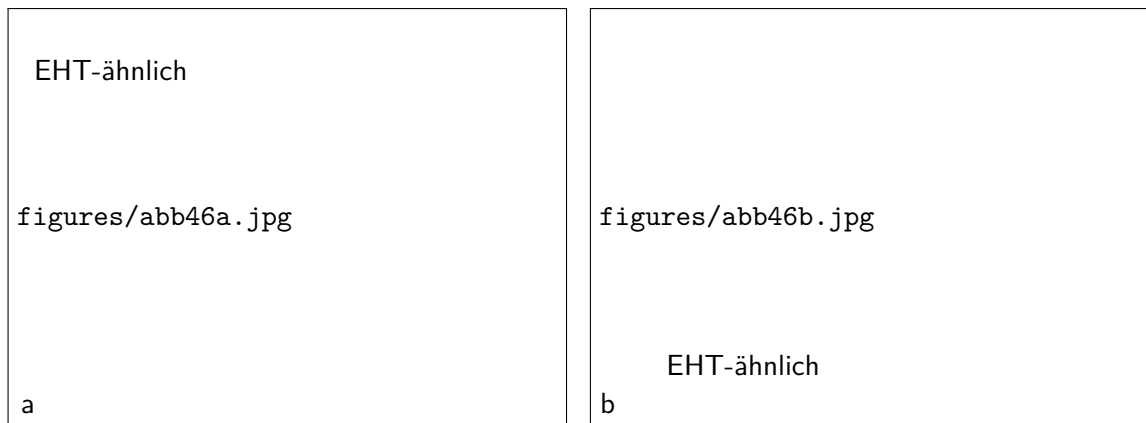


Abbildung 4.39: Tumoranteile: EHT-ähnlich und Tumor innen. HE-Färbung. (a) Oben links: äußere Oberfläche, die dem EHT-Gewebe ähnelte; unten rechts: innerer unspezifischer Anteil des Tumors, der wesentlich zellreicher war und sich somit auch basophiler darstellte. 50-fache Vergrößerung. (b) 200-fache Vergrößerung von (a).

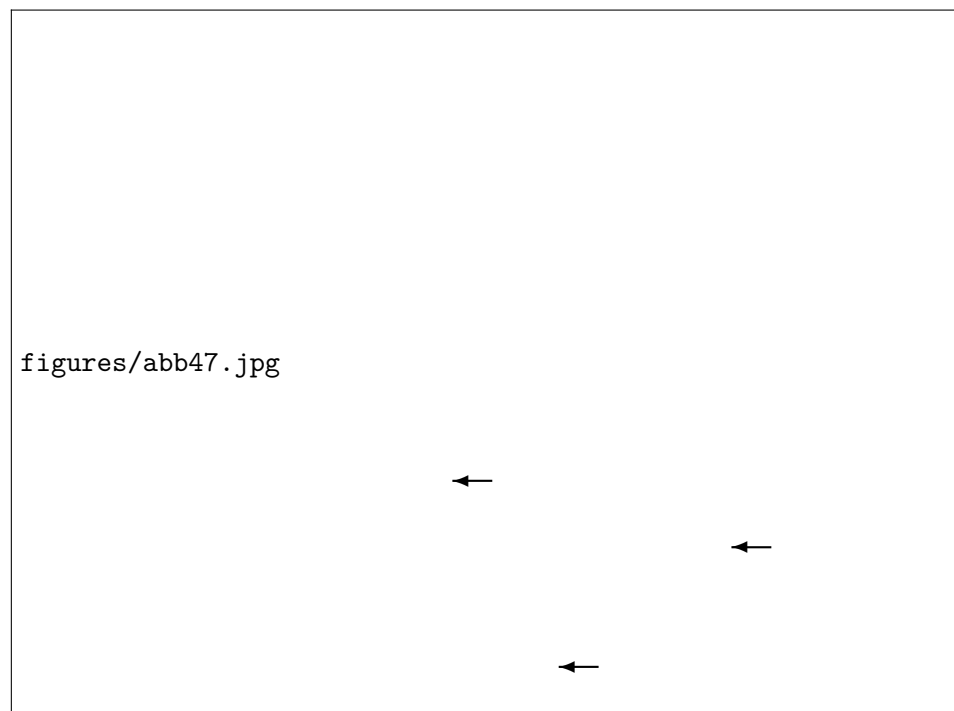


Abbildung 4.40: Infiltratives Wachstum des Tumors. HE-Färbung. Infiltration des eosinophilen Herzgewebes durch das basophile Tumorgewebe (Pfeile). Am Übergang vom Herzen zum Tumor ließen sich zudem vermehrt inflammatorische basophile Zellen erkennen. 100-fache Vergrößerung.

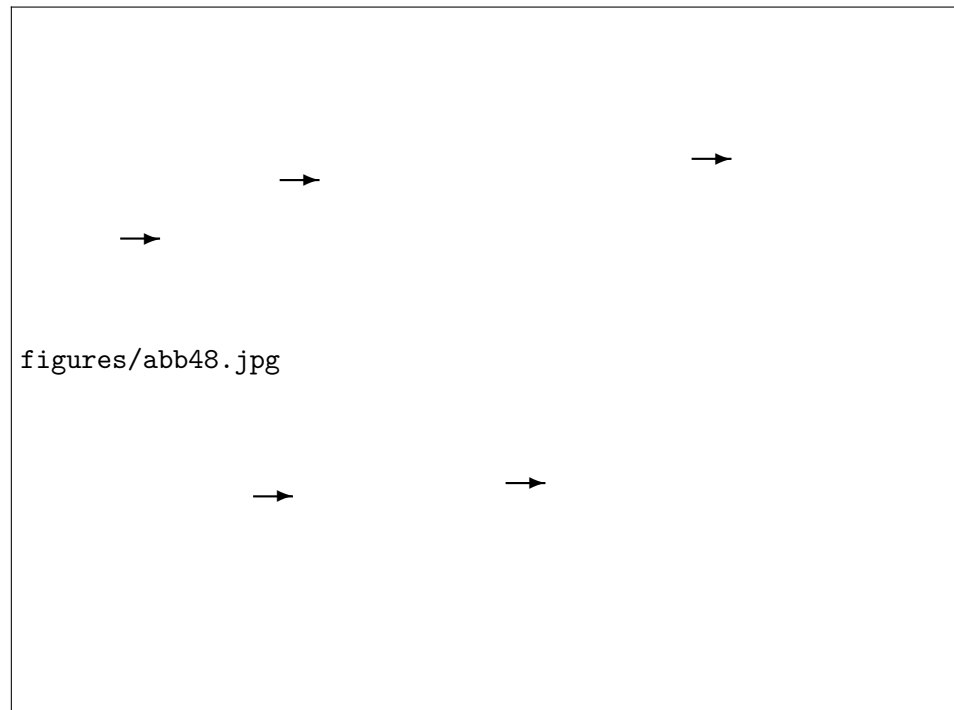


Abbildung 4.41: Histologisches Bild der infiltrativ wachsenden Tumorzellen. HE-Färbung. Ausschnitt aus einem Areal mit infiltrativ wachsendem Tumorgewebe aus Abbildung 4.40. Das eosinophile Herzgewebe war mit diffus verteilten Tumorzellen durchsetzt (Pfeile). Tumorzellen wiesen einen vergrößerten hypochromatischen Zellkern mit vereinzelt vorkommenden Nukleoli auf. 400-fache Vergrößerung.

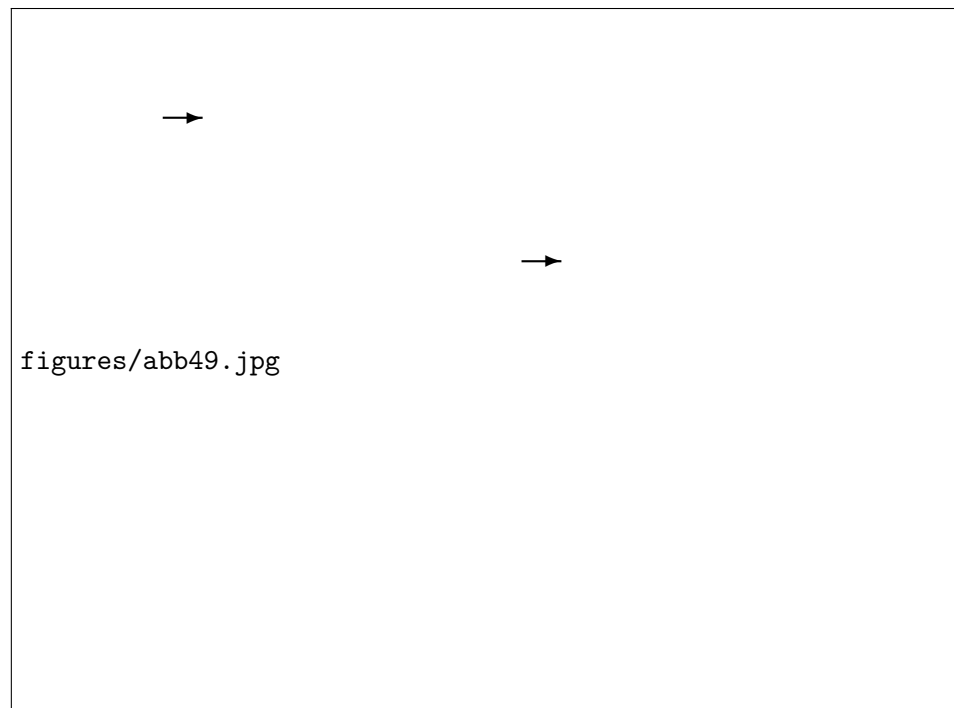


Abbildung 4.42: Wachstumsmuster des Tumors. HE-Färbung. Ausschnitt des Tumors mit storiformem Wachstumsmuster. Schwarze Pfeile: Nukleoli, weiße Pfeile: Mitosen. 400-fache Vergrößerung.

werden konnten, war die überwiegende Mehrzahl der Zellkerne übergroß mit vesikulärem Aussehen, welches wiederum in einer hypochromatischen Färbung resultierte. Das Wachstumsmuster war überwiegend ungerichtet und storiform (siehe Abbildung 4.42). Einige Kollagensepten trugen zu einer knotigen Unterteilung bei. An der Tumor-Herz-Grenze und besonders bei Infiltrationsgebieten wurden viele inflammatorische Zellen gesichtet, hauptsächlich bestehend aus Lymphozyten (siehe Abbildung 4.40).

Die histologische Architektur und die Tatsache, dass der Tumor mesenchymalen Ursprungs war (entstammte vom cMSC-ET), wiesen daraufhin, dass es sich höchstwahrscheinlich um ein Weichteilsarkom handelte. In der HE-Färbung zeigte sich der maligne Tumor undifferenziert. Differenzierungscharakteristika, wie Lipoblasten für Liposarkome oder Osteoidformationen für Osteosarkome, konnten nicht entdeckt werden. Auch atypische polynukleäre Riesenzellen wurden nicht entdeckt, wie es für maligne Riesenzelltumore des Weichteilgewebes nach [Angervall et al. 1981, Guccion und Enzinger 1972] zu erwarten gewesen wäre.

### 4.3.3 Qualitative Expression von CD3, CD20 und CD45

Der Tumor präsentierte ein stark dedifferenziertes histologisches Bild, wodurch die Tumorentität nicht sicher bestimmt werden konnte. Aufgrund der immunsuppressiven Behandlung der Versuchstiere kam neben einem Weichteilsarkom noch am ehesten ein hochmalignes Lymphom in Frage. Zu den drei orientierend erfassenden Markern eines Lymphoms zählen: CD3, CD20 und CD45. Diese Antigene werden ebenfalls auf der Oberfläche von Immunzellen exprimiert. CD3 findet sich bei T-Lymphozyten, CD20 bei B-Zellen und CD45 kann auf allen Leukozyten nachgewiesen werden.

Das Tumorgewebe wurde mittels immunhistochemischer Färbungen auf die Existenz dieser drei Antigene überprüft. Als Positivkontrolle fungierte Milzgewebe der Ratte, da es sich bei der Milz um ein lymphatisches Organ handelt. Die Untersuchung ergab, dass keines dieser drei Antigene vom Tumorgewebe exprimiert wurde (siehe Abbildungen 4.43 bis 4.45) und ein Lymphom somit ausgeschlossen werden konnte. Zusammenfassend ließen das dedifferenzierte histologische Bild, die Abstammung von mesenchymalen Stammzellen und der Ausschluss eines Lymphoms auf ein undifferenziertes pleomorphes Sarkom (not otherwise specified, NOS) als Tumorentität schließen.

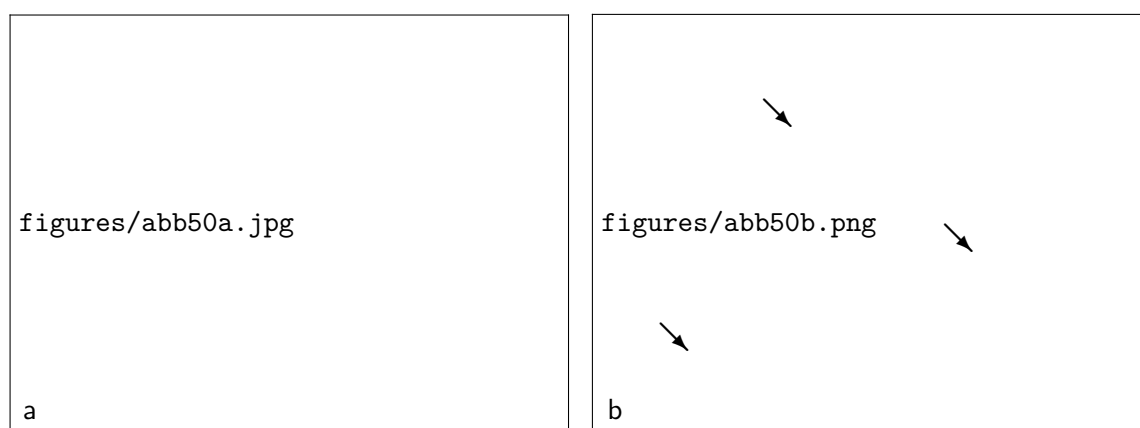


Abbildung 4.43: Immunhistochemische CD3-Färbung des Tumors. Rot: CD3-positive Zellen, blau: Zellkerne. (a) Übersichtsbild vom Tumorgewebe ohne Nachweis von CD3-positiven Zellen. (b) Übersichtsbild vom Milzgewebe der Ratte mit CD3-positiven Zellen (Pfeile). 400-fache Vergrößerung.

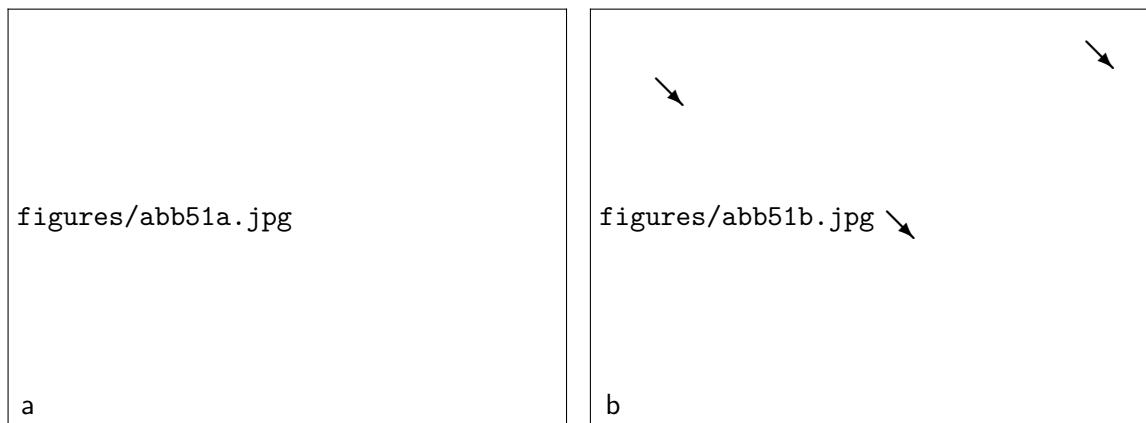


Abbildung 4.44: Immunhistochemische CD20-Färbung des Tumors. Rot: CD20-positive Zellen, blau: Zellkerne. (a) Übersichtsbild vom Tumorgewebe ohne Nachweis von CD20-positiven Zellen. (b) Übersichtsbild vom Milzgewebe der Ratte mit CD20-positiven Zellen (Pfeile). 400-fache Vergrößerung.

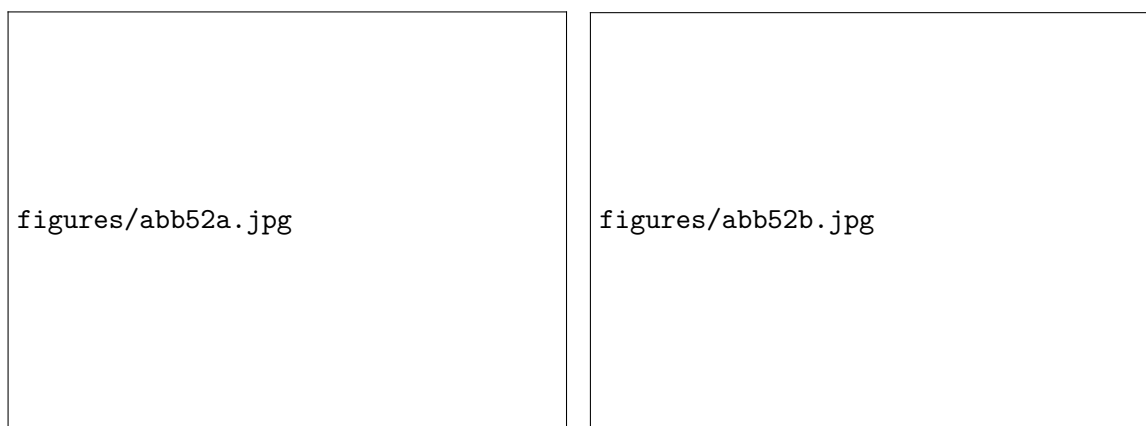


Abbildung 4.45: CD45-Immunfluoreszenzfärbung des Tumors. Grün: CD45-positive Zellen, blau: DAPI-Kernfärbung. (a) Übersichtsbild vom Tumorgewebe ohne Nachweis von CD45-positiven Zellen. (b) Übersichtsbild vom Milzgewebe der Ratte mit reichlich CD45-positiven Zellen. 400-fache Vergrößerung.

#### 4.3.4 Grading des Weichteilsarkoms

Es gibt zwei anerkannte Grading-Systeme für Weichteilsarkome. In der folgenden Auswertung kam das FNCLCC-System (Fédération Nationale des Centre de Lutte contre le cancer) zur Anwendung, da es besser mit der klinischen Prognose korreliert als das NCI-System (National Cancer Institute) [Guillou et al. 1997]. Das FNCLCC-System basiert auf den drei Parametern: Tumordifferenzierung, Mitoseaktivität und Nekroseanteil, wobei das Grading wesentlich von den beiden Erstgenannten abhängig ist (siehe Tabelle 6.3).

Das Weichteilsarkom wies ein undifferenziertes Muster auf, welches nicht eindeutig einem bestimmten Typ zuzuordnen war (Score = 3). Des Weiteren wurden in 10 High-Power-Fields (1 HPF = 0,1734 mm<sup>2</sup>) 41 Mitosen gezählt (Score = 3). Weniger als 50 % des Tumorgewebes bestanden aus nekrotischen Arealen (Score = 1). Zusammengefasst ergab sich ein Gesamtscore von 7/8. Dies entspricht dem Grad 3 und somit einem hochgradig malignen Weichteilsarkom [Deyrup und Weiss 2006, Guillou et al. 1997].





Abbildung 4.46: CD90-Expression des Sarkoms. Immunfluoreszenzdoppelfärbung, grün: CD90, blau: DAPI-Kernfärbung, rot: Chicagoblau. (a) Unten links: äußere Oberfläche des Sarkoms (EHT-ähnliches Gewebe), oben rechts: Übergang zum Tumorinneren in Richtung Herzgewebe. Es lässt sich eine deutliche Abnahme der grünen Fluoreszenz (CD90-Expression) von außen nach innen erkennen (vgl. äquivalenten Ausschnitt in Abbildung 4.39a). (b) Innere des Sarkoms ohne CD90-Expression (vgl. äquivalenten Ausschnitt in Abbildung 4.42). 400-fache Vergrößerung.

#### 4.3.5 Qualitative Expression von CD90

Der Stammzellmarker CD90 wurde gut an den oberflächlichen Außenbereichen des Sarkoms, welche teilweise an EHT-Gewebe erinnerten, exprimiert. Bei Betrachtung des Malignoms von der EHT-ähnlichen Oberfläche nach innen in Richtung Herzgewebe zeigte sich mit Verschlechterung des Differenzierungsgrades eine deutliche Abnahme der CD90-Expression (Abbildung 4.46a). Darüber hinaus konnte im inneren undifferenzierten Sarkom ein vollständiger Verlust der CD90-Expression festgestellt werden (Abbildung 4.46b).

#### 4.3.6 Verteilung der kardialen Connexine

Da es umstritten ist, ob invasives Tumorwachstum die Abwesenheit einer Gap-Junction-Kommunikation zum nativen Gewebe voraussetzt, sollte hier im inneren Bereich des Tumors und vor allem an der Tumor-Herz-Grenze untersucht werden, ob die Tumorzellen die für das Herz typischen Connexine exprimieren und damit die Voraussetzungen hätten mit den Kardiomyozyten zu kommunizieren.

Die Immunfluoreszenzfärbungen ergaben, dass die Tumorzellen im Innen- und Außenbereich des Sarkoms positiv für die drei kardialen Connexine Cx40, Cx43 und Cx45 waren, wenngleich Cx43, verglichen mit den anderen, den höchsten Expressionsgrad aufwies. Auffällig war, dass die quantitative Connexin-Expression der Sarkomzellen in zwei Areale unterteilt werden konnte. Areal 1 entsprach dem Tumorgewebe selbst und Areal 2 entsprach der Übergangszone zwischen Sarkom und Herzgewebe einschließlich der infiltrativ wachsenden Tumorzellen. Viele der Sarkomzellen waren positiv für alle drei Connexine, während diese in unmittelbarer Nähe der Übergangszone ihr positives Connexin-Signal nahezu vollständig verloren (siehe Abbildung 4.47). Dementsprechend konnten unter Zusammenfassung der prozentualen Cx40-, Cx43- und Cx45-Expressionen der Tumorzellen ein signifikanter Abfall vom Tumorinneren zur Tumor-Herz-Grenze nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ ; siehe Abbildung 4.48).



Abbildung 4.47: Expression und Verteilung der Connexine im Sarkomgewebe. Immunfluoreszenz-doppelfärbungen, grün: jeweiliges Connexin, blau: DAPI-Kernfärbung, rot: Chiacigoblau. In einer Reihe sind für das jeweilige Connexin ein Ausschnitt aus dem inneren Tumorgewebe (links) und aus dem Tumor-Herz-Übergang (rechts) gegenübergestellt. (a/c/e) Zu beobachten war eine gleichmäßige Verteilung der Connexine im Zytoplasma der Tumorzellen ohne Signalverstärkungen an den Zellpolen benachbarter Zellen. Der Expressionsgrad von Cx43 war höher als Cx45 und Cx40. (b/d/f) In allen Tumor-Herz-Übergängen verloren die Tumorzellen die Connexin-Signale. Das Herzgewebe wies typische Connexin-Akzentuierung an den Zell-Zell-Polen auf (Pfeile). (c-f) Zusätzlich imponierten große rundliche Zellen, die Cx45 oder Cx40 stark exprimierten im Tumorrinneren, an der Tumor-Herz-Grenze oder in Gefäßnähe (Pfeile). 400-fache Vergrößerung.

p < 0,0001		
tables/quantitative-cx-expression-tumor-innen-und-tumor-herz-grenze.pdf		

	Tumor innen	Tumor-Herz-Grenze
Zusammengefasste Expression von Cx40, Cx43 und Cx45	29,7 ± 6,1 %	3,7 ± 1,7 %
Cx40-Expression	20 %	2 %
Cx43-Expression	28 %	2 %
Cx45-Expression	41 %	7 %

Abbildung 4.48: Quantitative Cx-Expression: Tumor innen und Tumor-Herz-Grenze. Je Connexin und jeweiliger Lokalisation wurden 100 Tumorzellen randomisiert ausgezählt.

Jedes der Connexine war gleichmäßig im Zytoplasma der Tumorzellen verteilt, während die Plasmamembran nahezu frei von immunopositivem Connexin-Signal war und keinerlei Akzentuierungen zeigte. Insbesondere wurden keine selektiven Fluoreszenzintensivierungen zwischen Nachbarzellen an der Zell-Zell-Grenze gefunden, was das Vorhandensein von funktionellen Gap Junctions weniger möglich erscheinen lies (siehe Abbildung 4.47a/c/e). Im Gegensatz dazu wurde im Herzgewebe die typische Connexin-Lokalisation in der Plasmamembran mit Akzentuierung an den Zell-Zell-Kontakten, vor allem der Zellpole, gefunden (siehe Abbildung 4.47b/d/f).

Überraschenderweise konnten mit den Färbungen relativ große rundliche Zellen detektiert werden, die überaus positiv für Cx40 oder Cx45 waren, nicht aber für Cx43. Einige dieser Zellen wurden im interzellulären Gewebe des Herzens entdeckt, die meisten befanden sich allerdings in der Übergangszone und im Sarkom. Einige der Cx40- oder Cx45-positiven Zellen waren teilweise mit Gefäßen assoziiert (siehe Abbildung 4.47c-f). Es bleibt unklar, um welchen Zelltyp es sich hierbei handelte. Eine denkbare Möglichkeit wären jedoch Immunzellen. Zum einen waren die Cx40- oder Cx45-positiven Zellen besonders in Inflammationsgebieten, wie der Tumor-Herz-Grenze, aufzufinden, zum anderen wurden einige der Immunzellen durch Oviedo-Orta et al. unlängst als Connexin-exprimierende Zellen beschrieben [Oviedo-Orta et al. 2000, Oviedo-Orta und Howard 2004].

#### 4.3.6.1 Ki-67- und Connexin-Co-Expression

Nachdem sich zeigte, dass an der Tumor-Herz-Grenze kaum oder gar keine Connexine exprimiert wurden, stellte sich die Frage, ob die Nichtexpression der Connexine von der Proliferation der Zellen abhing. Hierzu sollte die Co-Expression des allgemeinen Proliferationsmarkers Ki-67 mit den kardialen Connexinen Cx40, Cx43 und Cx45 untersucht werden. Dafür wurden in der Auswertung der Immunfluoreszenzbilder drei Lokalisationen unterschieden: Tumor innen, Tumor-Herz-Grenze und natives Herzgewebe. Im inneren Tumorgewebe fanden sich erwartungsgemäß viele Ki-67-positive Zellen, aber nur sehr wenige Zellen die sowohl Ki-67 als auch Connexine exprimierten (siehe Abbildung 4.49).



Abbildung 4.49: Ki-67- und Connexin-Co-Expression der Sarkomzellen. Immunfluoreszenzdreifachfärbungen, grün: Ki-67, rot: jeweiliges Connexin, blau: DAPI-Kernfärbung. (a-c) Co-Expressionen von entweder Cx43, Cx45 oder Cx40 mit Ki-67 bei 1000-facher Vergrößerung. (d) Übersichtsaufnahme von (a) bei 400-facher Vergrößerung. Die Abbildung ist dominiert von nicht-exprimierenden Zellen (grüner Pfeil) und Zellen, die entweder positiv für Ki-67 (orangener Pfeil) oder für Cx43 (roter Pfeil) sind. Hingegen sind nur wenige Zellen zu erkennen, die sowohl Cx43 als auch Ki-67 exprimieren (weißer Pfeil).

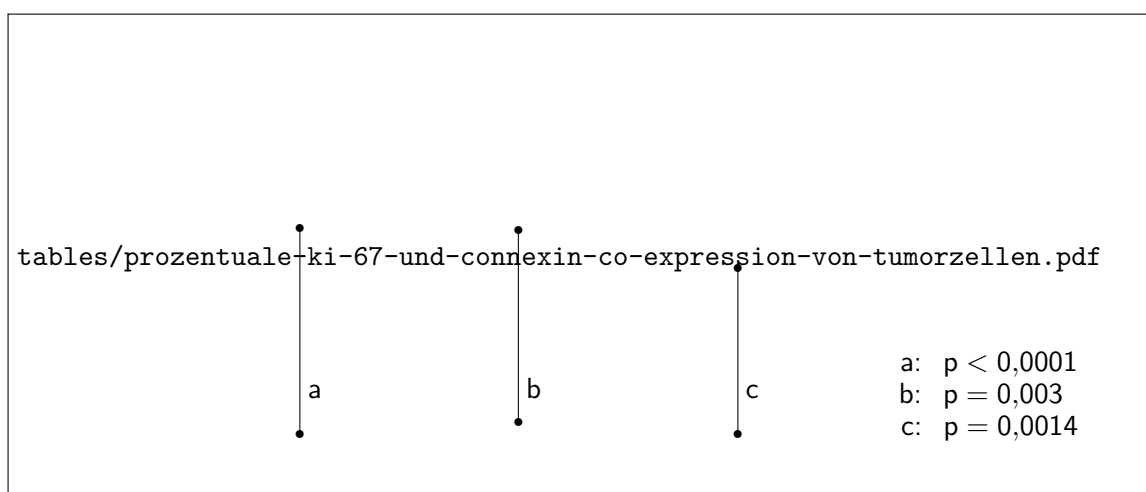


Abbildung 4.50: Prozentuale Ki-67- und Connexin-Co-Expression von Tumorzellen. Es wurden jeweils 100 Tumorzellen aus dem Bereich des Tumorrinneren für Cx43, Cx45 und Cx40 randomisiert ausgezählt.

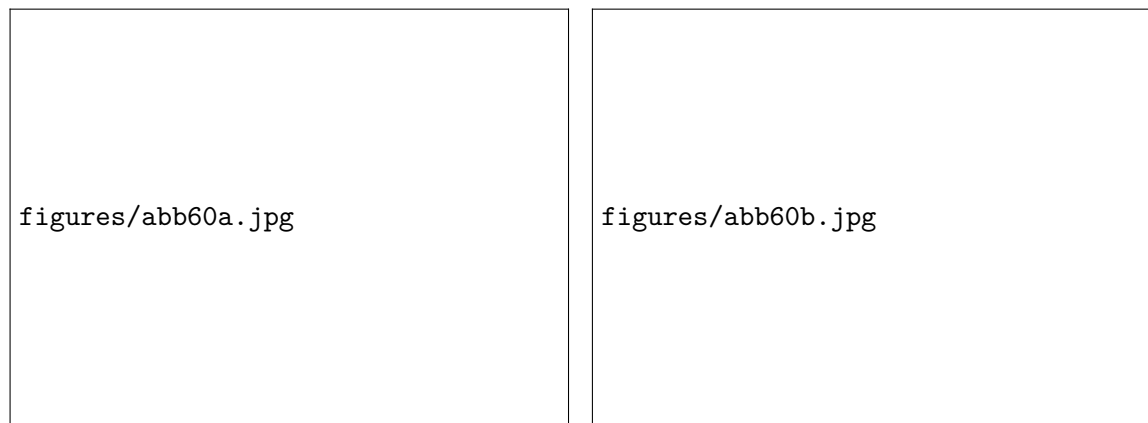


Abbildung 4.51: Ki-67- und Connexin-Färbung: Tumor-Herz-Grenze und Herzgewebe. Immunfluoreszenzdreifachfärbung, grün: Ki-67, rot: Cx43, blau: DAPI-Kernfärbung. (a) Tumor-Herz-Grenze: angeschnittenes Herzgewebe wurde mit Pfeilen markiert. Das unmittelbar angrenzende Sarkom wies eine Vielzahl von Ki-67-exprimierenden Zellen auf. Dagegen waren weder Cx43- und Ki-67-positive Zellen noch ausschließlich Cx43-positiven Zellen zu erkennen. (b) Natives Herzgewebe: auch hier waren weder Cx43- und Ki-67-positive Zellen noch ausschließlich Ki-67-positive Zellen zu erkennen. Die weißen Pfeile markieren die rot-fluoreszierenden typischen Connexin-Banden. 400-fache Vergrößerung.

In der quantitativen Auswertung zeigte sich im Tumorrinneren ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Proliferation und dem Fehlen von Connexin-Expression. Das bedeutet, dass eine Tumorzelle sowohl eines der Connexine als auch Ki-67 exprimierte, schloss sich signifikant gegeneinander aus, wenn auch auf unterschiedlich hohen Signifikanzniveaus: Cx43 ( $p < 0,0001$ ), Cx45 ( $p = 0,003$ ), Cx40 ( $p = 0,0014$ ) (siehe Abbildung 4.50).

An der Tumor-Herz-Grenze und im nativen Herzgewebe konnten keine Connexin- und Ki-67-Co-lokaliserten Zellen gefunden werden (siehe Abbildung 4.51a), mit Ausnahme von 2% Cx45- und Ki-67-exprimierenden Zellen an der Tumor-Herz-Grenze. Außerdem wurde an der Tumor-Herz-Grenze eine Verschiebung hin zu Ki-67-positiven Zellen beobachtet ( $p = 0,0007$ ), was bedeutet, dass dort eine stärkere proliferative Aktivität vorhanden war als in der Mitte des Tumors (siehe Abbildung 4.52).

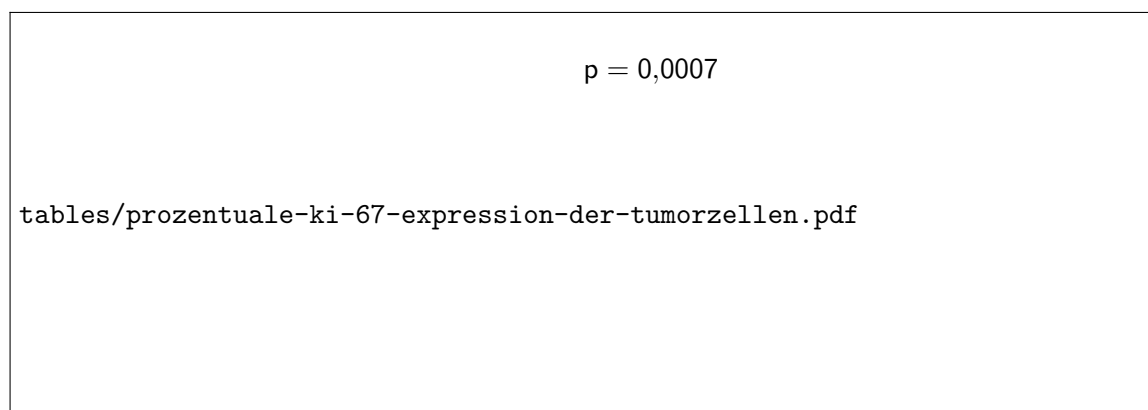


Abbildung 4.52: Prozentuale Ki-67-Expression der Tumorzellen. Vergleich Tumor innen und Tumor-Herz-Grenze. Es wurden jeweils 100 Tumorzellen je Lokalisation randomisiert ausgezählt.

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit ist es gelungen formstabile, transplantationsfähige Engineered Tissues mit zwei verschiedenen mesenchymalen Stammzelllinien herzustellen, statt mit den üblichen neonatalen Kardiomyozyten. Ähnlich wie die konventionellen EHTs wiesen die MSC-ETs in vitro histomorphologisch keine elastischen Fasern, einen großen Kollagenanteil und vereinzelt Mikrogefäße auf, allerdings keine Myozyten. 30 Tage nach Implantation waren die MSC-ETs, wie die regulären EHTs, strukturell und vaskulär um das native Herzgewebe integriert und synthetisierten elastische Fasern de novo. Elastische Fasern sind Bestandteil der extrazellulären Matrix und werden typischerweise nur von Fibroblasten, die aktive Form der Fibrozyten, aber auch zu einem geringen Anteil von glatten Muskelzellen in Arterien synthetisiert und sezerniert [Schiebler und Korf 2007].

In der vorangegangenen Dissertation von Martin Nichtitz gelang es, die Existenz von Fibroblasten in den konventionellen In-vitro-EHTs über eine immunhistologische Färbung der Prolyl-4-Hydroxylase- $\beta$ , einem Fibroblasten-spezifischen Enzym, nachzuweisen [Nichtitz 2009]. In den EHTs wurden keine anderen Zellen nachgewiesen, von denen bekannt wäre, dass sie elastische Fasern produzieren können. Daher liegt es nahe anzunehmen, dass wahrscheinlich Fibroblasten die Quelle der Produktion elastischer Fasern waren. In den MSC-ETs wurde auf einen speziellen Nachweis von Fibroblasten verzichtet. Da MSCs jedoch nachweislich in der Lage sind, sich in Zellen der mesenchymalen Linie zu differenzieren [Pittenger et al. 1999], wäre es denkbar, dass aus ihnen Fibroblasten hervorgegangen waren. Für diese Annahme würde ebenfalls sprechen, dass die Expression des mesenchymalen Stammzellmarkers CD90 von den Zellen der MSC-ETs von in vitro nach in vivo signifikant abnahm. Dieses Verhalten könnte als Differenzierungsprozess gewertet werden, denn so ist für hämatopoetische Stammzellen unlängst bekannt, dass diese mit zunehmender Reifung und Differenzierung ihren spezifischen Stammzellmarker CD34 verlieren [Peichev et al. 2000, Simmons et al. 1992]. Als eine weitere Quelle für die Bildung von elastischen Fasern sind, sowohl in den regulären EHTs als auch in den MSC-ETs, eingewanderte Fibroblasten im Zuge eines Wundheilungsprozesses denkbar.

Die auslösenden Mechanismen die zur Synthese von elastischen Fasern führen, sind noch weitestgehend ungeklärt und daher Bestandteil aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen [Kielty et al. 2002]. Eine Tatsache ist aber, dass elastische Fasern reichlich in Geweben vorkommen, deren Funktionalität in hohem Maße von reversibler Dehnbarkeit abhängig ist, wie etwa Arterien vom elastischen Typ (herznah), Lunge, Haut und elastischer Knorpel [Welsch 2010]. Den EHTs und MSC-ETs war ein offensichtlicher Unterschied zwischen In-vitro- und In-vivo-Situation gemeinsam. Nach ihrer Implantation waren sie einem neu aufgetretenen permanenten Dehnungsprozess durch die unmittelbare Nachbarschaft zum kontrahierenden Herzen ausgesetzt. So könnte der Dehnungsreiz einen Trigger zur physiologischen Anpassung mittels De-novo-Synthese der elastischen Fasern dargestellt haben.

Überraschenderweise entwickelten konventionelle EHTs und MSC-ETs bereits unter In-vitro-Bedingungen vereinzelt Mikrogefäße. Die Entwicklung eines ausgereiften Gefäßbettes ist ein komplexer und dynamischer Entwicklungsprozess. Voraussetzung sind eine koordinierte Rekrutierung und Proliferation von Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen durch das lokale Vorkommen von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen und Proteinasen [Carmeliet 2000]. Neben den vorhandenen stoffwechselaktiven Zellen stellte das Matrigel die Voraussetzung für eine gelungene Vaskulogenese in den EHTs und

MSC-ETs dar, da es neben extrazellulärer Matrix auch eine Reihe von Wachstumsfaktoren (TGF $\beta$ , Fibroblasten-Wachstumsfaktor, epidermaler Wachstumsfaktor, insulinähnlicher Wachstumsfaktor, Gewebsplasminogen-Aktivator) beinhaltet [Vukicevic et al. 1992] sowie zu geringen Mengen aus Matrix-Metalloproteinasen besteht [Mackay et al. 1993]. Da die Zellen der regulären EHTs aus einem Verdau von Rattenherzen gewonnen wurden, bestanden diese nachweislich neben Kardiomyozyten und Fibrozyten auch aus Endothelzellen [Nichtitz 2009, Zimmermann et al. 2002]. Hingegen wurden die MSC-ETs zu 100 % aus mesenchymalen Stammzellen gebildet. Eine seltene Zellpopulation, die aus dem Knochenmark stammt und in der Lage ist in Endothelzellen zu differenzieren, sind endotheliale Vorläuferzellen (engl. endothelial progenitor cells, EPCs). Als charakteristisches Erkennungsmerkmal exprimieren EPCs CD34 [Asahara et al. 1997, 1999]. Da sich alle MSC-Linien in der Durchflussszytometrie negativ für dieses Oberflächenantigen zeigten, kann eine Verunreinigung bei der Knochenmarkpräparation mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Ferner besteht daher nur die Möglichkeit, dass sich die Endothelzellen aus den MSCs selbst differenziert haben.

Diese Hypothese wird von mehreren Erkenntnissen, die der Reihe nach experimentell gewonnen werden konnten, unterstützt. Oswald et al. veröffentlichten bereits 2004, dass humane, aus Knochenmark gewonnene MSCs (CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-, CD14-, CD133-) unter In-vitro-Bedingungen mit der Präsenz von 2 % fetalen Kälberserums und 50 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF) sich zu Zellen mit phänotypischen und funktionellen Merkmalen von Endothelzellen differenzieren lassen [Oswald et al. 2004]. Bei VEGF handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der Vaskulogenese (De-novo-Gefäßbildung) und Angiogenese einnimmt [Ferrara et al. 2003]. Mesenchymale Stammzellen von unterschiedlichen Spezies sind in der Lage VEGF zu synthetisieren und zu sezernieren. So konnte in einer DNA-Profilanalyse von murinen, aus Knochenmark gewonnenen MSCs (CD44+, CD71+, Sca-1+, CD45-, CD90-) mittels cDNA-Microarrays die Expression von VEGF nachgewiesen werden [Wieczorek et al. 2003]. Ebenso zeigten In-vitro-Kulturen von humanen, aus Knochenmark gewonnene MSCs (CD13+, CD44+, CD105+, SH2+, SH3+, CD34-, CD45-) hohe Expressionslevel von VEGF [Kagiwada et al. 2008] und durch Stimuli wie Hypoxie konnte die Freisetzung von VEGF und Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (engl. fibroblast growth factor, FGF) sogar nochmals signifikant erhöht werden [Crisostomo et al. 2008]. Darüber hinaus konnten Schlegel et al. zeigen, dass es möglich ist mononukleäre Zellen des Knochenmarks (BMMNCs) von Minischweinen in endothelzell-ähnliche Zellen zu transformieren. Diese reprogrammierten BMMNCs entwickelten eine Kopfsteinpflaster-Morphologie, die typisch ist für Endothelzellen. Sie exprimierten den Endothelzellmarker vWF und in spektrophotometrischen Untersuchungen wiesen sie eine ähnliche Stickstofffreisetzung auf wie venöse Endothelzellen [Schlegel et al. 2013]. In vitro erfolgte die Versorgung der Zellen in den EHTs und MSC-ETs ausschließlich über Diffusion, sodass, erkennbar an der Verteilung und Ausreifung der Zellen, mit zunehmender Eindringtiefe der Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff zunahm [Nichtitz 2009]. Daher wäre es vorstellbar, dass die MSCs in der hypoxischen Umgebung der ETs Wachstumsfaktoren wie VEGF vermehrt selbst freisetzen und gleichzeitig darüber zur eigenen endothelialen Differenzierung beitragen.

Im gleichen Kontext beschrieben In-vivo-Studien mit Tiermodellen für dilatative Kardiomyopathie und Myokardischämie eine verstärkte Neovaskularisation des Myokards nach MSC-Transplantation. Als Ursache wurden ebenfalls die endotheliale Differenzierungskapazität und die erhöhte parakrine Exkretion von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren diskutiert [Nagaya et al. 2005, Tang et al. 2006].

Mit dem Wissen über die angiogenetische Potenz der MSCs überraschte es aber, dass die signifikante Zunahme der Gefäßdichte und die Ausdifferenzierung der Gefäßstrukturen (Perimeter und Wanddicke) in den EHTs und MSC-ETs nach Implantation gleich ausgeprägt waren; sich also unabhängig von der eingesetzten Zellsorte zeigten.

Für die EHTs als auch die MSC-ETs änderten sich mit Implantation um das Rattenherz die physiologischen Umgebungsbedingungen. Akut fehlte das Kulturmedium als Nährstofflieferant, wodurch das künstliche Gewebe einer Stresssituation mit erhöhter Hypoxie ausgesetzt war. Zudem wurden mit dem Annähen des EHTs oder des MSC-ETs an das Herzgewebe neben lokalen Verbindungen auch Verletzungen geschaffen. Insofern kann die Gefäßneubildung als Teil eines interaktiven Wundheilungsprozesses betrachtet werden. Tatsächlich konnte für EHTs aus neonatalen Kardiomyozyten von [Zimmermann et al. 2002] unlängst gezeigt werden, dass früh nach Implantation um ein Rattenherz vom Empfänger abgeleitete Blutgefäße in das EHT einwuchsen. Zum anderen waren Blutgefäße innerhalb der implantierten Gewebe zumindest teilweise aus Zellen der EHTs aufgebaut. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen formulierten Zimmermann et al. die Hypothesen, dass die Empfängerblutgefäße die primitiven Mikrogefäße der EHTs durch deren Einwachsen kontaktierten oder dass EHT-Zellen während der De-novo-Vaskularisierung rekrutiert wurden [Zimmermann et al. 2006b]. Aufgrund der vielfältigen Wechselwirkungen (Zellmigration, Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren, etc.) bleibt es schwer zu beantworten, wie viel Anteil an der Vaskulogenese beim EHT bzw. MSC-ET und wie viel beim Empfängerorganismus lag. Dies kann letztlich nur sicher durch vorherige Markierung der Zellen geklärt werden.

Während beim generellen Vergleich der EHTs versus MSC-ETs kein statistisch belegbarer Unterschied bezüglich der Gefäßquantität und -qualität festgestellt werden konnte, konnten beim genaueren Vergleich der sMSC-ETs versus cMSC-ETs Unterschiede in der Gefäßdichte sowie der Gefäßwanddicke aufgedeckt werden, welche signifikant durch die Zellsorte beeinflusst wurden. Ebenso wurde die Bildung von elastischen Fasern durch den Einsatz von entweder sMSCs oder cMSCs signifikant beeinflusst.

Die Charakterisierung der MSC-Linien deckte eine morphologische Heterogenität der selbst isolierten MSCs auf (zusätzliches Vorkommen von runden Zellen). Unterstützt durch die Gegebenheit, dass ein geringer prozentualer Anteil der sMSCs CD45 exprimiert, ist davon auszugehen, dass diese anteilig durch hämatopoetische Linien verunreinigt waren. CD45, auch als leukocyte common antigen (LCA) bezeichnet, kann von allen kernhaltigen, differenzierten, hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, mit Ausnahme von Plasmazellen [Pilarski und Jensen 1992]. Leukozyten stellen den zellulären Teil des Immunsystems und werden in fünf verschiedene Hauptklassen eingeteilt: Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie waren alle getesteten sMSCs 3–4 Wochen alt. Eine deutlich kürzere Überlebensdauer ist für Monozyten und Granulozyten bekannt, sodass diese als Beifangzellen sicher ausgeschlossen werden können [Kiefel 2010]. Ebenso wahrscheinlich auszuschließen sind dendritische Zellen, da diese typischerweise zytoplasmatische Ausläufer und Cluster in Zellkultur bilden [Romani et al. 1994]. Die verunreinigende Zellart wies dagegen eine runde Morphologie auf. Nach den Ausschlusskriterien bleiben Makrophagen und Lymphozyten als wahrscheinlichste Beifangzellen bestehen. Beide sind in der Lage sogenannten Zytokine zu sezernieren. Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Peptiden, die vor allem die Proliferation und die Differenzierung von Zellen regulieren. Die angenommene zusätzliche Anwesenheit bestimmter Zytokine innerhalb der sMSC könnte nicht nur erklären, warum die Bildung von Gefäßen und elastischen Fasern innerhalb der EHTs signifikant von der eingesetzten Zellsorte beeinflusst wurde, es würde auch über einen hemmenden Effekt erklären,



warum die sMSCs in Zellkultur eine deutlich niedriger Proliferations- und Adipozytendifferenzierungsrate als die cMSCs aufwiesen. Für eine sichere Identifizierung der Beifangzellen wären weitere durchflusszytometrische Messungen spezifischer Oberflächenantigene nötig, wie beispielsweise CD4 und CD8 für T-Lymphozyten [Kiefel 2010].

Trotz allem bildeten beide Typen von MSC-ETs, im Gegensatz zu den EHTs, nicht wie erhofft Kardiomyozyten aus. Die vorliegende Arbeit wurde auf die Erkenntnis ausgerichtet, dass eine Co-Kultivierung von fetalen und adulten Kardiomyozyten mit MSCs über parakrine und zellkontaktabhängige Mechanismen zu einer Hochregulation von kardiomyogenen Markern in MSCs führen kann [Wang et al. 2006, Yoon et al. 2005]. Allerdings konnten weder die direkte Herzumgebung nach Implantation mit parakriner und mechanischer Stimulation (Herzkontraktionen), noch die Elektrostimulation unter In-vitro-Kultur den geeigneten Anreiz für die MSCs liefern sich in Richtung Kardiomyozyten zu differenzieren.

Unter Hinzugabe des Zytostatikums 5-Azazytidin konnten in vergangenen In-vitro-Studien aus MSCs Kardiomyozyten-ähnliche Zellen ohne Querstreifung transdifferenziert werden [Makino et al. 1999, Rangappa et al. 2003]. Bis heute ist jedoch ungewiss, wie das Zytostatikum 5-Azazytidin die Zellen molekular verändert. Nachgewiesen ist hingegen dessen onkogenes Potenzial und klinische Toxizität [Benedict et al. 1977, Fukuda und Yuasa 2006]. Zudem ist in [Mastitskaya und Denecke 2009] eine In-vitro-Studie veröffentlicht, in der unterschiedlichste kardiomyogene Differenzierungsprotokolle an humanen MSCs, einschließlich 5-Azazytidin, überprüft wurden. Die Studien ergaben, dass die MSCs ausnahmslos scheiterten funktionsfähige Kardiomyozyten zu bilden. Lediglich ein Teil der Zellen wiesen eine erhöhte kardiale Genexpression auf. Schonendere Methoden mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder nicht toxischen chemischen Verbindungen konnten bislang nicht erfolgreich etabliert werden [Fukuda und Yuasa 2006], sodass in der vorliegenden Arbeit bewusst auf eine Vordifferenzierung der MSCs in vitro verzichtet wurde. Gemessen an den neuesten Entwicklungen stellt sich jedoch überraschend die Frage, ob nicht sogar ein gewisser Zellstress notwendig ist, um eine erweiterte Differenzierungsfähigkeit zu erreichen. Obokata et al. konnten eindrucksvoll nachweisen, dass eine kurzfristige Behandlung von somatischen Zellen im sauren pH-Bereich ( $\text{pH} = 5,7$ ) ausreicht, um pluripotente Zellen zu generieren [Obokata et al. 2014].

Ob MSCs in vivo eine kardiomyozytäre Differenzierung durchlaufen können, ist derzeitiger Gegenstand einer kontrovers geführten Debatte. Mehrere Publikationen berichteten über ein sehr schwaches Überleben von direkt in den Herzmuskel injizierten MSCs. So konnten beispielsweise 14 Tage nach Implantation in ein Schweinmodell für Myokardinfarkt noch 5 % und vier Tage nach Implantation in gesunde Mausherzen gerade einmal 0,44 % der MSCs detektiert werden. In beiden Studien waren jedoch die wenigen überlebenden Zellen positiv für myozytäre Proteine und in der letzteren konnten sogar kardiales Troponin T und Querstreifung unter starker Vergrößerung nachgewiesen werden [Shake et al. 2002, Toma et al. 2002].

In einem anderen Myokardinfarktmodell, hergestellt in transgen markierten Mäusen, wurden ebenfalls äußerst wenige Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, generiert aus implantierten MSCs, gefunden. Da die MSCs ebenso transgen markiert waren, konnte für die Mehrzahl der myogen differenzierten Zellen gezeigt werden, dass hierfür eine zelluläre Fusion mit Empfänger-kardiomyozyten und nicht etwa eine Transdifferenzierung verantwortlich war [Noiseux et al. 2006]. Auch weitere Gruppen berichteten, dass transplantierte MSCs mit residenten Kardiomyozyten fusionieren und deren Phänotyp annehmen, anstatt sich tatsächlich in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren [Matsuura et al. 2004b, Alvarez-Dolado et al. 2003].

Grundsätzlich werden zwei Formen der Zellfusion unterschieden. Verschmelzen lediglich die Zellmembranen miteinander entsteht eine Hybridzelle mit zwei Zellkernen. Im Falle einer Fusion der Kernmembranen entsteht eine Zelle mit dem vierfachen Chromosomensatz und nur einem Kern [Gordon 1975]. Darauf basierend konnten andere Arbeitsgruppen der Fusionstheorie widersprechen, indem sie für neu generierte Kardiomyozyten nach MSC-Transplantation eine Mehrkernigkeit ausschließen und einen zweifachen Chromosomensatz nachweisen konnten [Kajstura et al. 2005, Pochampally et al. 2004]. Andererseits konnten Garbade et al., mittels unterschiedlich Fluoreszenz-markierter Co-Kulturen von humanen BMCs und neonatalen Kardiomyozyten der Ratte, sowohl den Nachweis für spontane Zellfusion als auch für Transdifferenzierung von BMCs erbringen [Garbade et al. 2005].

Schließlich stellt sich die Frage ob mesenchymale Stammzellen überhaupt in ausreichendem Maße die Möglichkeit besitzen sich in Kardiomyozyten zu differenzieren oder ob sie in ihrer Differenzierung schon zu weit vorangeschritten sind.

Unlängst hat eine neue Stammzellpopulation, genannt „induzierte pluripotente Stammzellen“ (IPS-Zellen) auf sich aufmerksam gemacht. Entsprechend der Namensgebung handelt es sich bei IPS-Zellen um pluripotente Stammzellen, die mittels einer forcierten Expression spezifischer Gene künstlich aus adulten somatischen Zellen abgeleitet werden. Neuere Veröffentlichungen zeigten eine eindeutige Differenzierung von murinen und humanen IPS-Zellen in Kardiomyozyten. Ferner wiesen elektrophysiologische Untersuchungen daraufhin, dass sie in der Lage sind sich in nodal-, atrial- und ventrikel-ähnliche Zellen zu entwickeln [Schenke-Layland et al. 2008, Zhang et al. 2009, Ma et al. 2011].

Zusammenfassend sind IPS-Zellen ebenso wie MSCs ethisch unbedenklich und verhältnismäßig leicht verfügbar, weisen aber nach derzeitigem Kenntnisstand eine ausgeprägtere Differenzierungskapazität auf, sodass sie sich vermutlich eher für kardiales Tissue Engineering eignen.

Neben der Differenzierungsfähigkeit von adulten mesenchymalen Stammzellen ist gegenwärtig ein weiterer wissenschaftlicher Diskussionspunkt in den Vordergrund gerückt, nämlich deren biologische Sicherheit. Krebserregende oder krebswachstumsfördernde Wirkungen gehören zu den Risiken, die im Vorfeld von möglichen klinischen Therapien stets ausgeschlossen werden müssen. So demonstrieren die aktuellen Versuche, dass niedrig-passagierte mesenchymale Stammzellen aus Rattenknochenmark der Passage 6 prinzipiell in der Lage sind in vivo maligne zu transformieren.

Die Lokalität, der histologische Phänotyp und die Wachstumsrichtung wiesen deutlich daraufhin, dass die tumoröse Struktur dem cMSC-ET entsprang. Unter der Annahme, dass sich der Tumor aus undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen entwickelt hatte, war es nicht überraschend, dass im histologischen Bild keinerlei Differenzierungsmerkmale von reifen mesenchymalen Geweben aufzufinden waren. Daher auch die Hypothese, dass es sich um ein pleomorphes undifferenziertes Sarkom (not otherwise specified, NOS) handelte. Gemäß den Leitlinien zufolge ist dies aber eine Ausschlussdiagnose [Dei Tos 2006]. Als beweisend für ein NOS gelten der Ausschluss von sogenannten Differenzierungslinien (epithelial, myogen, endothelial, neurogen, melanozytär) mittels einer breiten Palette von immunhistochemischen Färbungen und entsprechende molekular- und zytogenetische Analysen [Katenkamp und Katenkamp 2009]. Auf diese aufwendigen Verfahren konnte mangels Kapazitäten nicht zurückgegriffen werden. Eine solche wissenschaftliche Erkenntnis ist in der Klinik wegen des Therapieentscheides elementar. In der vorliegenden Studie war jedoch viel entscheidender, dass sich ein hochmaligner Prozess mit invasivem Wachstum nach dem Einsatz von cMSCs herausgebildet hatte. Aufgrund der kombinierten Immunsuppression mit Cyclosporin und Azathioprin sowie der Befundkonstellation kam am ehesten noch ein hochmalignes Lymphom in Frage. Mittels einer orientierend erfassenden

Immunhistochemie von CD3, CD20 und CD45 konnte dies jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden [Spath et al. 2013]. Die Tatsache, dass Leontyev et al. einer Vielzahl von Sprague-Dawley-Ratten unter derselben Immunsuppression reguläre EHTs um die Herzen implantierten ohne ähnliche maligne Entartungen zu beobachten, ließ ein Lymphom ohnehin unwahrscheinlich erscheinen [Leontyev et al. 2013].

Trotz allem kann nicht mit allerletzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der Tumor einen anderen Ursprung als die MSCs hatte. Um hierzu eine annähernd sichere Aussage geben zu können, hätten restlos alle MSCs mit einem zeitlich stabilen Marker markiert werden müssen. Da dies technisch hoch anspruchsvoll ist, verfälschte Ergebnisse durch Zellfusionen möglich sind und nebenbei eine Veränderung der MSCs auf molekularer Ebene durch einen solchen Marker nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, wurde darauf in der Planung und Durchführung verzichtet.

Überdies wird die These der sarkomatös transformierten cMSCs durch zunehmende Berichte, die ähnliche Beobachtungen beschrieben, unterstützt. Sowohl vielfach passagierte murine BM-MSCs als auch humane aus Fettzellen gewonnene MSCs (P16-P20) waren spontan in der Lage in vitro zu malignen Zellen zu degenerieren und nicht spezifizierte Tumore oder Fibrosarkome in Mäusen zu bilden [Miura et al. 2006, Rubio et al. 2005]. Des Weiteren konnten sogar niedrig passagierte murine BM-MSCs numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen durchlaufen und in vivo in verschiedenen Geweben (Skelettmuskel, Lunge, Herz) unterschiedlichste Sarkomentitäten bilden, darunter auch unspezifische pleomorphe Sarkome [Aguilar et al. 2007, Tolar et al. 2007, Zhou et al. 2006].

Da humane Zellen weniger anfällig gegenüber Immortalisierung und Transformation in Zellkultur sind als murine Zellen [Prowse und Greider 1995], überrascht es nicht, dass bislang kein tumorigenes Potential für niedrig passagierte humane MSCs nachgewiesen werden konnte.

Mit Aufnahme der vorliegenden Dissertation gab es allerdings auch keine Veröffentlichungen zur malignen Transformation von MSCs der Ratte. Erstmals 2009 wurde für niedrig-passagierte MSCs ( $\leq P3$ ), generiert aus Knochenmark von Ratten (CD29+, CD44+, CD90+, CD117 moderat+, CD34-, CD45-), In-vitro-Entartung beschrieben. Nach intrakardialer Transplantation derselben Zellen in ein Rattenmodell für akuten Myokardinfarkt konnten jedoch keine Tumore gefunden werden [Furlani et al. 2009]. In der vorliegenden Arbeit kam es im Gegensatz dazu nicht zu auffälligen Veränderungen der beiden aus Rattenknochenmark gewonnenen MSC-Linien in vitro. Stattdessen wurde aber in einer von insgesamt drei cMSC-ET-implantierten Ratten die Entwicklung eines Sarkoms beobachtet. Solche Beobachtungen konnten jedoch nicht für sMSC-ET-Implantationen gemacht werden. Somit stellt sich unweigerlich die Frage nach Unterschieden zwischen den cMSCs und den sMSCs.

Beide Zelllinien wurden nicht zuvor immortalisiert, genetisch modifiziert oder aus zu Wiedererkennungszwecken markiert. Dessen ungeachtet wiesen die cMSCs, erkennbar an Passagierintervallen und Einsaatdichten, eine deutlich höhere proliferative Aktivität auf als die sMSCs. Zusätzlich gab es zwischen den Zellsorten, wie bereits ausführlich diskutiert, deutliche Verschiedenheiten in der Morphologie und in der Fähigkeit Gefäße und elastische Fasern innerhalb der MSC-ETs zu bilden. Die hierfür verantwortlich gemachten Leukozyten, die die sMSC-Kulturen verunreinigten, könnten zusätzlich als Wächterzellen fungiert haben und über Markierung und Phagozytose eine Entartung des sMSC-ETs verhindert haben.

Unabhängig davon existieren wissenschaftliche Überlegungen, die die sogenannte Stammzellnische, die unmittelbare physiologische Mikroumgebung in der sich Stammzellen befinden, mit der Tumorentstehung in Verbindung bringen [Li und Neaves 2006, Kuhn und Tuan

2010]. Eine Hypothese ist, dass Krebsstammzellen eher in einer Umgebung entstehen, die von wachstumsfördernden Signalen dominiert wird anstatt von inhibitorischen Signalen [Li und Neaves 2006]. Die natürliche Nische der hier genutzten cMSCs ist das Knochenmark der Sprague-Dawley-Ratte. Aus diesem wurden sie isoliert und in die Mikroumgebung der Wachstumsfaktor-reichen ETs eingebracht. Eine maligne Transformation der cMSCs konnte allerdings nur in vivo beobachtet werden. Nach Implantation erhielt diese Nische über Vaskularisation eine verbesserte Ernährungssituation und gleichzeitig Anschluss an einen immunsupprimierten Organismus.

In Anbetracht des Zusammenkommens von hochproliferativ aktiven cMSCs und einer künstlichen Stammzellnische mit hohen Wachstumsfaktorraten, gut eingestellter nutritiver Versorgung und verminderter Anwesenheit von immunaktiven Zellen, ist es durchaus denkbar, dass ein Ungleichgewicht zugunsten der wachstumsfördernden Komponenten geherrscht hat. Dies könnte, gemäß der Hypothese von Li und Neaves, eine Transformation der cMSCs begünstigt oder sogar eine notwendige Bedingung dargestellt haben.

Als limitierender Faktor dieser Diskussion sollte die Präprozessierung der cMSCs erwähnt werden, über die keine ausreichenden Informationen vom Hersteller zur Verfügung standen.

Bei der immunhistochemischen Analyse des Sarkoms konnte eindeutig festgestellt werden, dass die CD90-Expression vom Grad der Dedifferenzierung abhängig war und ferner undifferenzierte Zellen frei von CD90 waren. Diese Beobachtungen werden von [Wang et al. 2005] unterstrichen, die eine transformierte Subpopulation, entstanden aus einer In-vitro-BM-MSC-Kultur (human), untersuchten und mittels FACS-Analyse eine geringere CD90-Expression als in typischen BM-MSCs feststellten. Damit würde die Abnahme der CD90-Expression nicht nur wie eingangs vermutet Differenzierungsprozesse anzeigen können, sondern ebenso maligne Transformationsprozesse. Daher würde sich das Protein CD90 zur onkologischen Monitorisierung im zukünftigen Einsatz von MSCs anbieten.

Die Beobachtungen bezüglich der charakteristischen Connexin-Expressionsmuster des pleomorphen Sarkoms reihen sich in eine Jahrzehnte andauernde wissenschaftliche Diskussion über die Rolle der Gap Junction vermittelten interzellulären Kommunikation (GJIC) sowie Connexin-Expression in Tumoren ein.

Schon 1966 wurde durch Loewenstein und Kanno das erste Beispiel für down-regulierte GJIC in Krebszellen publiziert. Darin schlussfolgerten sie, dass Krebszellen über einen Mangel an löslicher inhibitorischer Zell-Zell-Kommunikation oder GJIC charakterisiert werden könnten [Loewenstein und Kanno 1966].

In der vorliegenden Arbeit wurden im Tumorinneren ungefähr 30 % Connexin-positive Zellen mit Cx40, Cx43 und Cx45 detektiert. Deren Connexine verteilten sich allerdings eher gleichmäßig im Zytoplasma ohne Akzentuierungen an den Zellmembranen, wie sie typisch sind für Gap-Junction-Formationen. Ähnlich abberante Expressionsmuster konnten für Cx32 und Cx43 in kolorektalen Adenomen und sogar verstärkt in Karzinomen gezeigt werden [Kanczuga-Koda et al. 2010]. Hinzukommend ergab eine Studie von 20 Primärtumoren der Leber (verschiedene Malignitätsgrade) eine hauptsächlich aberrante Lokalisation von Cx32. Immunhistochemisch wurde das Cx32 hauptsächlich intrazytoplasmatisch nachgewiesen. Selten wurde es in Plasmamembranen detektiert, die dann jedoch keinen Kontakt zu anderen Zellen aufwiesen. In keinem der untersuchten Tumoren konnte hierbei eine Genmutation des Cx32 festgestellt werden [Krutovskikh et al. 1994].

Nach [Yamasaki et al. 1995] manifestiert sich eine gestörte GJIC in zwei verschiedenen Typen. Zum einen in der homologen GJIC, die zwischen gleichartigen Zellen (entweder normal oder tumorös) und zum anderen in der heterologen GJIC, die zwischen Zellen unter-

schiedlicher Art (zwischen normal und tumorös) stattfindet. Entsprechend dieser Theorie unterlagen im gegenwärtigen Fall die Sarkomzellen im Inneren des Tumors einer gestörten homologen GJIC. Denn die Connexine der Sarkomzellen wurden hauptsächlich intrazytoplasmatisch nachgewiesen. So konnten bildmorphologisch keine membranären Verbindungen zwischen benachbarten Sarkomzellen gezeigt werden, welche für eine funktionierende Kommunikation zwischen den Zellen, also einer homologen GJIC, nötig gewesen wären. Am Übergang vom Tumor- zum Herzgewebe waren sie hingegen vermutlich kaum in der Lage eine heterologe GJIC aufzubauen, da in diesem Bereich tumorseitig nahezu keine kardialen Connexine exprimiert wurden.

Mehrere Studien legen weiterhin die Vermutung nahe, dass der Verlust der Connexin-Expression eine Schlüsselfunktion für die Tumorprogression und -invasion darstellt. So konnte bei Cx32-defizitären Mäusen eine vielfach erhöhte Spontanentwicklung von Lebertumoren beobachtet werden als bei Wildtypmäusen [Moennikes et al. 2000, Temme et al. 1997]. Darüber hinaus wurden für den Übergang vom humanen Carcinoma in situ zum invasiven Seminom ein zunehmender bis vollständiger Verlust der Cx43-Genexpression ermittelt [Brehm et al. 2006]. Ebenso konnten für humane ovarielle Karzinomzellen eine deutlich geringere Cx43-Expression und GJIC gezeigt werden als für humane ovarielle Epithelzellen [Hanna et al. 1999].

Gegensätzlich dazu konnte in humanen Melanomläsionen, die invasiv in die Dermis einwuchsen, eine signifikant erhöhte Cx26-Expression bestimmt werden, verglichen mit nicht invasiven Melanomzellen [Ito et al. 2000]. Gleichwohl wurde eine Hochregulation von Cx43 in unmittelbaren Kontaktbereichen zwischen Zellen eines Mamakarzinoms und pulmonalen Endothelzellen sowie in Mikrometastasen beobachtet [Elzarrad et al. 2008]. In beiden Beobachtungen schien die vermehrte Connexin-Expression und nicht der Verlust der Connexin-Expression eine wichtige Voraussetzung sowohl in der lokalen Tumordinvasion als auch in der Metastasierung eingenommen zu haben.

In der Zwischenzeit jedoch mehrten sich die Berichte darüber, dass die induzierte Expressionszunahme von Connexinen unabhängig von einer funktionellen GJIC den Progress in untersuchten Tumorentitäten reduzieren kann [Huang et al. 1998, Ionta et al. 2009, King et al. 2000]. Für Cx43 konnte gezeigt werden, dass es ebenfalls die Proliferation hemmt, wenn die GJIC durch pharmakologische Substanzen blockiert oder eine Kanalformation verhindert wurde [Moorby und Patel 2001].

Daraus konnte geschlossen werden, dass nicht nur wie ursprünglich angenommen die Zell-Zell-Kommunikation über die Vermittlung von Signalmolekülen die Zellproliferation reguliert, sondern ebenso dass Connexine ihrerseits dazu in der Lage sind als Tumorsuppressoren zu fungieren [Ionta et al. 2009]. Mittels Cx43-Transfektion von Osteosarkomen konnte der Zellzyklusübergang von G1 nach S über eine veränderte Expression der Zellzykluskontrollproteine p27 und SKp2 inhibiert werden [Zhang et al. 2001, 2003a]. Aufbauend darauf konnten Zhang et al. zeigen, dass ausschließlich die Überexpression von unveränderten Cx43, bedingt durch eine verminderte Stabilität des Zellzykluskontrollproteins Skp2, zu einer gehemmten Zellproliferation führt; nicht aber die Überexpression einer Cx43-Mutation ohne Carboxy-Terminus [Zhang et al. 2003b]. Der Carboxy-Terminus ist eine nicht Kanal-formende Domäne des Connexins. Zahlreiche andere Studien konnten Hinweise darauf liefern, dass Cx43 speziell über seinen C-Terminus Genexpression und Zellwachstum beeinflussen kann. Dang et al. konnten zeigen, dass die alleinige Expression des C-Terminus von Cx43 mit Anreicherung im Zellkern ausreicht, um das Wachstum von HeLa-Zellen effizient zu supprimieren [Dang et al. 2003]. Außerdem ist der Carboxy-Terminus von Cx43 in der Lage  $\beta$ -Catenin zu binden und somit dessen zytosolische Konzentration zu regulieren. Die Reduktion von Cx43 oder Phosphorylierung von Serin-262 über Fibroblasten-

Wachstumsfaktor-2 (FGF-2) kann zu einer erhöhten Konzentration von  $\beta$ -Catenin führen, welches wiederum nach Translokation in den Zellkern an die Proteinkomplexe TCF/LEF bindet, wodurch die Transkription von Genen aktiviert wird, die zur Proliferation benötigt werden, wie beispielsweise Cyclin D1, c-Myc und c-Jun [Ai et al. 2000, Holnthoner et al. 2002].

Zudem konnte durch Cx43-Transfektion eine Hochregulation von CCN-Proteinen (Cyr61, connective tissue growth factor, nephroblastoma overexpressed) in C6-Gliomzellen gezeigt werden [Fu et al. 2004]. CCN-Proteine spielen neben Wundheilung, Zellproliferation und Differenzierung auch eine Rolle in Tumorigenese und Wachstumsregulierung [Perbal 2004, Zuo et al. 2010]. CCN3 als ein Mitglied dieser Familie kann ebenfalls mit dem Carboxy-Terminus von Cx43 interagieren und darüber Zellproliferation inhibieren [Fu et al. 2004, Gellhaus et al. 2004]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in humanen Gliomen eine inverse Korrelation zwischen dem Maß der Cx43-Expression und dem Grad der Malignität anhand Ki-67-kalkulierter Mitoseindizes gezeigt werden [Soroceanu et al. 2001]. Auch die vorliegenden Ergebnisse bezüglich der Co-Lokalisation des Proliferationsmarkers Ki-67 mit den jeweiligen kardialen Connexinen konnten glaubhaft zeigen, dass die Connexin-Expression und das Tumorstadium des Sarkoms in Wechselbeziehung zueinander standen. Es befand sich also fast keine der Connexin-exprimierenden Zellen in Proliferation und vice versa nahezu keine der proliferativen Zellen exprimierte Connexine.

Aufgrund fehlender funktioneller Versuche mit beispielsweise Dye-Coupling bleibt allerdings offen, ob die Tumorprogression und -invasion auf eine gestörte Funktionsfähigkeit der GJIC, auf zellgebundene molekulare Veränderungen oder auf ein Zusammenspiel der genannten Möglichkeiten zurückzuführen ist. Anhand der Ergebnisse liegt jedoch die Vermutung nahe, dass der Zellzyklus durch die Connexin-Expression beeinflusst wurde und mehr noch ein Verlust der Connexin-Expression eine zwingende Voraussetzung für das invasive Wachstum darstellte.

Als Limitation sollte in Betracht gezogen werden, dass ausschließlich kardiale Connexine und nicht alle 21 Isoformen untersucht wurden. Da sich jedoch die Frage stellte, ob die Tumorzellen mit dem nativen Herzgewebe Gap Junctions ausbildeten, schloss dies nur kardiale Isoformen ein.

# 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

**Tissue Engineering eines dreidimensionalen Herzgewebes unter Einsatz von Mesenchymalen Stammzellen und histologische Untersuchung des Gewebes auf Integration und Zelldifferenzierung in einem In-vivo-Rattenmodell**

Eingereicht von:

Cathleen Spath

Angefertigt an der:

Universität Leipzig am Herzzentrum Leipzig

Betreut von:

Prof. Dr. med. Stefan Dhein

November 2014

Das Tissue Engineering ist ein aktueller Forschungsansatz der kardialen regenerativen Medizin. Das Ziel ist die künstliche Herstellung von funktionellem transplantationsfähigen Myokardgewebes bzw. langfristig die Herstellung vollständiger Herzen als Organersatz.

Am Herzzentrum Leipzig konnte bereits aufbauend auf vorhergehende In-vitro-Studien von Zimmermann et al. unter Einsatz von neonatalen Kardiomyozyten ein dreidimensionales vaskularisiertes Engineered Heart Tissue (EHT) etabliert werden [Zimmermann et al. 2000, 2006b, Nichtitz 2009]. Dieser künstlich hergestellte Ring wurde elektrisch stimuliert und war in der Lage nach 14 Tagen in Kultur selbstständig zu kontrahieren. Die positiven Effekte von EHTs in der Behandlung des Myokardinfarktes und der dilatativen Kardiomyopathie bei Ratten konnten bereits gezeigt werden [Zimmermann et al. 2006b, Leontyev et al. 2013].

In erster Instanz sollte die vorliegende Arbeit dazu dienen EHTs hinsichtlich humaner Einsatzfähigkeit weiterzuentwickeln. Dafür wurden die neonatalen Kardiomyozyten aus den bereits etablierten EHTs durch mesenchymale Stammzellen (MSCs) ersetzt. MSCs können autolog aus fast jedem Körpergewebe gewonnen werden und sind somit ethisch und immunologisch unbedenklich. Es wurden zwei unterschiedliche Typen von MSCs aus dem Knochenmark der Ratte eingesetzt: kommerziell erworbene MSCs (cMSCs) und selbst isolierte MSCs (sMSCs).

Es ist gelungen formstabile, transplantationsfähige Engineered Tissues sowohl aus den cMSCs (cMSC-ETs) als auch aus den sMSCs (sMSC-ETs) herzustellen. Bereits in vitro hatten sich in den künstlich hergestellten cMSC-ETs und sMSC-ETs Mikrogefäße entwickelt. Nach Implantation der MSC-ETs verbesserte sich deren Vaskularisierung signifikant. Die MSC-ETs waren sowohl strukturell als auch vaskulär lückenlos zum nativen Herzgewebe integriert. Zusätzlich konnte in vivo eine De-novo-Synthese von elastischen Fasern als Zeichen eines Anpassungsprozesses nachgewiesen werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit, nämlich die kardiale Differenzierung der MSCs, wurde jedoch verfehlt. Parallel zu diesem Ergebnis wurde indes die kardiomyozytäre Differenzierbarkeit von MSCs zunehmend wissenschaftlich in Frage gestellt. Letztlich steht bis heute der endgültige Beweis aus, ob MSCs überhaupt die Fähigkeit besitzen sich in funktionelle echte Kardiomyozyten zu differenzieren.

Überdies entwickelte sich aus einem der drei implantierten cMSC-ETs überraschenderweise ein hochmalignes undifferenziertes pleomorphes Sarkom, welches infiltrierend in das Rattenherz einwuchs. Verglichen mit den sMSCs verfügten die cMSCs über eine vielfach erhöhte Proliferationsrate und waren nicht mit Leukozyten verunreinigt. Das Fehlen von Leukozyten führte zu der Annahme, dass die cMSCs in der Umgebung der ETs überwiegend wachstumsfördernde und zu wenig inhibitorische Signale erhalten haben könnten.

Eine der wichtigsten Feststellungen über das vorliegende pleomorphe Sarkom war, dass dieses keine gewebespezifischen Connexine an Stellen des invasiven Wachstums exprimierte und nahezu keine am Übergang vom Tumor- zum Herzgewebe. Gleichwohl bestand zwischen proliferativer Aktivität und Connexin-Expression eine negative Korrelation. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Theorie von Kalimi et al., dass ein derartiger Tumor keine wachstumslimitierenden Signale vom umliegenden gesunden Gewebe über GJIC erhält, was wiederum zu einem ungehinderten infiltrativen Wachstum führen könnte [Kalimi et al. 1992]. Angesichts der neuerlichen wissenschaftlichen Erkenntnisse bezüglich der kanalunabhängigen Funktionen von Cx43 bleibt es ebenso denkbar, dass die Connexine ihrerseits über zellgebundene molekulare Wechselwirkungen die Tumorprogression beeinträchtigen können [Huang et al. 1998, King et al. 2000, Ionta et al. 2009].

Perspektivisch könnten sich hieraus zwei Möglichkeiten für pharmakologische Behandlungsansätze zur Wachstumskontrolle von Tumoren ergeben. Zum einen die Wiederherstellung der GJIC und zum anderen die Hochregulation von gewebespezifischen Connexinen innerhalb von Tumorzellen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass MSCs nicht für die Herstellung von artifiziellem Herzgewebe geeignet sind, wohl aber für die Herstellung von künstlichen Blutgefäßsystemen. Als sinnvolle Zellalternative bieten sich induzierte pluripotente Stammzellen (IPS-Zellen) an, da deren Differenzierbarkeit zu funktionellen Kardiomyozyten, im Gegensatz zu den MSCs, bereits glaubhaft bewiesen werden konnte [Schenke-Layland et al. 2008, Zhang et al. 2009, Ma et al. 2011]. Zudem sind IPS-Zellen autolog im ausreichenden Maße verfügbar und daher ethisch unbedenklich, wenngleich ein onkogenes Potenzial für diesen Zelltyp ebenfalls nicht ausgeschlossen werden kann.

Daher gilt es einheitliche Kontrollen und Sicherheitsmessungen in der Herstellung von pluripotenten wie auch multipotenten Stammzellen für zellbasierte Therapien zu entwickeln und verpflichtend einzuführen. Bei Patienten, die eine Stammzell-basierte Therapie erhalten, sollten langfristig angelegte Nachbeobachtungen im Hinblick auf eine mögliche Tumorentwicklung erfolgen.



# Abbildungsverzeichnis

3.1	Dot-Blot Diagramm der cMSCs in der 6. Passage . . . . .	26
3.2	Histogramm zum Dot-Blot aus Abbildung 3.1 . . . . .	27
3.3	Herstellung von EHTs . . . . .	31
3.4	Stimulationsapparat . . . . .	32
3.5	Selbst gefertigte Apparatur mit vier paarigen Schrittmacherelektroden . . . . .	32
3.6	Sprague-Dawley-Ratte in Injektionsnarkose . . . . .	33
3.7	EHT-Implantation . . . . .	33
4.1	MSCs in Zellkultur . . . . .	42
4.2	Durchflusszytometrische Analyse der sMSCs in der Passage 3 . . . . .	42
4.3	Durchflusszytometrische Analyse der cMSCs der Passage 6 . . . . .	43
4.4	Oil-Red-O-Färbung der MSCs . . . . .	43
4.5	Übersicht zu hergestellten EHTs und MSC-ETs . . . . .	44
4.6	Fertig kultiviertes EHT . . . . .	45
4.7	Azan-novum-Färbung von einem sMSC-ET in vivo . . . . .	45
4.8	Azan-novum-Färbung von MSC-ETs in vitro und in vivo . . . . .	47
4.9	Prozentualer Kollagenanteil am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET . . . . .	47
4.10	Prozentualer Kollagenanteil am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	48
4.11	Prozentualer Myozytenanteil am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET . . . . .	48
4.12	Prozentualer Myozytenanteil am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	48
4.13	Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines EHTs in vitro . . . . .	49
4.14	Immunfluoreszenzdreifachfärbung eines EHTs in vivo . . . . .	50
4.15	Immunfluoreszenzdreifachfärbung von MSC-ETs in vitro und in vivo . . . . .	50
4.16	Cx43-Expressionsraten: EHTs in vitro versus EHTs in vivo . . . . .	51
4.17	Cx43-Expressionsraten: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	51
4.18	Elastica-van-Gieson-Färbung von sMSC-ET in vitro und in vivo . . . . .	52
4.19	Anteil elastischer Fasern am Gesamtgewebe: EHT versus MSC-ET . . . . .	52
4.20	Anteil elastischer Fasern am Gesamtgewebe: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	53
4.21	Entwicklung der Gefäßstrukturen von in vitro nach in vivo . . . . .	53
4.22	Mittlere Wanddicke der Gefäße in $\mu\text{m}$ : EHT versus MSC-ET . . . . .	54
4.23	Mittlere Wanddicke der Gefäße in $\mu\text{m}$ : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	54
4.24	Ausbildung der Gefäßstrukturen: sMSC-ETs versus cMSC-ETs . . . . .	55
4.25	Anteil der Gefäßfläche an der Gesamtfläche: EHT versus MSC-ET . . . . .	55
4.26	Anteil der Gefäßfläche an der Gesamtfläche: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	56
4.27	Anzahl der Gefäße je $\text{mm}^2$ : EHT versus MSC-ET . . . . .	56
4.28	Anzahl der Gefäße je $\text{mm}^2$ : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	56
4.29	Mittlerer Gefäßperimeter in $\mu\text{m}$ : EHT versus MSC-ET . . . . .	57
4.30	Mittlerer Gefäßperimeter in $\mu\text{m}$ : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	57
4.31	Gefäßanteil der Klasse <i>Klein</i> : EHT versus MSC-ET . . . . .	58
4.32	Gefäßanteil der Klasse <i>Klein</i> : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	58
4.33	Gefäßanteil der Klasse <i>Mittel</i> : EHT versus MSC-ET . . . . .	59

4.34	Gefäßanteil der Klasse <i>Mittel</i> : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	59
4.35	Gefäßanteil der Klasse <i>Groß</i> : EHT versus MSC-ET . . . . .	59
4.36	Gefäßanteil der Klasse <i>Groß</i> : sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	60
4.37	CD90-Expressionrate: sMSC-ETs versus cMSC-ETs . . . . .	60
4.38	Tumor makroskopisch . . . . .	61
4.39	Tumoranteile: EHT-ähnlich und Tumor innen . . . . .	62
4.40	Infiltratives Wachstum des Tumors . . . . .	62
4.41	Histologisches Bild der infiltrativ wachsenden Tumorzellen . . . . .	63
4.42	Wachstumsmuster des Tumors . . . . .	63
4.43	Immunhistochemische CD3-Färbung des Tumors . . . . .	64
4.44	Immunhistochemische CD20-Färbung des Tumors . . . . .	65
4.45	CD45-Immunfluoreszenzfärbung des Tumors . . . . .	65
4.46	CD90-Expression des Sarkoms . . . . .	66
4.47	Expression und Verteilung der Connexine im Sarkomgewebe . . . . .	67
4.48	Quantitative Cx-Expression: Tumor innen und Tumor-Herz-Grenze . . . . .	68
4.49	Ki-67- und Connexin-Co-Expression der Sarkomzellen . . . . .	69
4.50	Prozentuale Ki-67- und Connexin-Co-Expression von Tumorzellen . . . . .	69
4.51	Ki-67- und Connexin-Färbung: Tumor-Herz-Grenze und Herzgewebe . . . . .	70
4.52	Prozentuale Ki-67-Expression der Tumorzellen . . . . .	70

# Tabellenverzeichnis

2.1	Geräte und Hilfsmittel . . . . .	12
2.2	Laborutensilien . . . . .	14
2.3	Allgemeine Chemikalien . . . . .	14
2.4	Chemikalien für Zellkultur . . . . .	15
2.5	Nährmedien und EHT-Komponenten . . . . .	15
2.6	Medikamente und Chemikalien für Tierexperimente . . . . .	16
2.7	Chemikalien für Histologie . . . . .	19
2.8	Primärantikörper . . . . .	19
2.9	Sekundärantikörper . . . . .	20
2.10	Markierte Antikörper für FACS . . . . .	20
3.1	Kardiomyozytenverdau . . . . .	29
3.2	Konstruktionsmix für zwei EHTs . . . . .	30
3.3	Einbettprogramm . . . . .	34
3.4	Antikörpermischungen . . . . .	39
6.1	Statistischer Vergleich: EHT versus MSC-ET . . . . .	100
6.2	Statistischer Vergleich: sMSC-ET versus cMSC-ET . . . . .	100
6.3	FNCLCC-System . . . . .	101

# Literaturverzeichnis

- Abdel-Latif, A., Bolli, R., Tleyjeh, I., Montori, V., Perin, E., Hornung, C., Zuba-Surma, E., Al-Mallah, M., und Dawn, B. (2007). Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 167(10):989–997.
- Adams, J.E., I., Bodor, G., vila Roman, V., Delmez, J., Apple, F., Ladenson, J., und Jaffe, A. (1993). Cardiac troponin i. a marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation*, 88(1):101–106.
- Aguilar, S., Nye, E., Chan, J., Loebinger, M., Spencer-Dene, B., Fisk, N., Stamp, G., Bonnet, D., und Janes, S. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells*, 25(6):1586–1594.
- Ai, Z., Fischer, A., Spray, D., Brown, A., und Fishman, G. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, 105(2):161–171.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J., Fike, J., Lee, H., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S., und Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961):968–973.
- Angervall, L., Hagmar, B., Kindblom, L., und Merck, C. (1981). Malignant giant cell tumor of soft tissues: a clinicopathologic, cytologic, ultrastructural, angiographic, and microangiographic study. *Cancer*, 47(4):736–747.
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., und Isner, J. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3):221–228.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der, Z. R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., und Isner, J. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–967.
- Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., und Zeiher, A. (2002). Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*, 106(24):3009–3017.
- Awad, H., Butler, D., Boivin, G., Smith, F., Malaviya, P., Huibregtse, B., und Caplan, A. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5(3):267–277.
- Beltrami, A., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., und Anversa, P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6):763–776.
- Benedict, W., Banerjee, A., Gardner, A., und Jones, P. (1977). Induction of morphological transformation in mouse c3h/10t1/2 clone 8 cells and chromosomal damage in hamster a(t1)c1-3 cells by cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Res*, 37(7):2202–2208.

- Berry, M., Engler, A., Woo, Y., Pirolli, T., Bish, L., Jayasankar, V., Morine, K., Gardner, T., Discher, D., und Sweeney, H. (2006). Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(6):2196–2203.
- Black, I. und Woodbury, D. (2001). Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis*, 27(3):632–636.
- Boyle, A., McNiece, I., und Hare, J. (2010). Mesenchymal stem cell therapy for cardiac repair. *Methods Mol Biol*, 660:65–84.
- Brehm, R., Ruttinger, C., Fischer, P., Gashaw, I., Winterhager, E., Kliesch, S., Bohle, R., Steger, K., und Bergmann, M. (2006). Transition from preinvasive carcinoma in situ to seminoma is accompanied by a reduction of connexin 43 expression in sertoli cells and germ cells. *Neoplasia*, 8(6):499–509.
- Burck, H.-C. (1981). *Histologische Technik*. Thieme, Stuttgart, 4 edition.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4):389–395.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., und Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11):2739–2749.
- Chan, J., O'Donoghue, K., Gavina, M., Torrente, Y., Kennea, N., Mehmet, H., Stewart, H., Watt, D., Morgan, J., und Fisk, N. (2006). Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells*, 24(8):1879–1891.
- Charbonneau, H., Tonks, N., Walsh, K., und Fischer, E. (1988). The leukocyte common antigen (cd45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(19):7182–7186.
- Crisostomo, P., Wang, Y., Markel, T., Wang, M., Lahm, T., und Meldrum, D. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by tnf-alpha, lps, or hypoxia produce growth factors by an nf kappa b- but not jnk-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294(3):675–682.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P., und Nardi, N. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119(11):2204–2213.
- Dai, W., Hale, S., Martin, B., Kuang, J., Dow, J., Wold, L., und Kloner, R. (2005). Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*, 112(2):214–223.
- Dang, X., Doble, B., und Kardami, E. (2003). The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem*, 242(1–2):35–38.
- Danielyan, L., Schafer, R., Schulz, A., Ladewig, T., Lourhmati, A., Buadze, M., Schmitt, A., Verleysdonk, S., Kabisch, D., Koeppen, K., Siegel, G., Proksch, B., Kluba, T., Eckert, A., Kohle, C., Schoneberg, T., Northoff, H., Schwab, M., und Gleiter, C. (2009). Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin. *Cell Death Differ*, 16(12):1599–1614.

- Dei Tos, A. (2006). Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? *Histopathology*, 48(1):51–62.
- Deyrup, A. und Weiss, S. (2006). Grading of soft tissue sarcomas: the challenge of providing precise information in an imprecise world. *Histopathology*, 48(1):42–50.
- Dobson, K. R., Reading, L., Haberey, M., Marine, X., und Scutt, A. (1999). Centrifugal isolation of bone marrow from bone: An improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femurae. *Calcified Tissue International*, 65(5):411–413.
- Dominici, M., Le, B. K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., und Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317.
- Egeler, R. (2014). Statistisches Bundesamt.
- Elzarrad, M., Haroon, A., Willecke, K., Dobrowolski, R., Gillespie, M., und Al-Mehdi, A. (2008). Connexin-43 upregulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium. *BMC Med*, 6(20).
- Eschenhagen, T. und Zimmermann, W. (2005). Engineering myocardial tissue. *Circ Res*, 97(12):1220–1231.
- Fazel, S., Chen, L., Weisel, R., Angoulvant, D., Seneviratne, C., Fazel, A., Cheung, P., Lam, J., Fedak, P., Yau, T., und Li, R. (2005). Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130(5).
- Ferrara, N., Gerber, H., und LeCouter, J. (2003). The biology of vegf and its receptors. *Nat Med*, 9(6):669–676.
- Ferrari, G., Cusella-De, A. G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G., und Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279(5356):1528–1530.
- Fletcher, C. (1992). Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? a critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 16(3):213–228.
- Friedenstein, A., Deriglasova, U., Kulagina, N., Panasuk, A., Rudakowa, S., Luria, E., und Ruadkow, I. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*, 2(2):83–92.
- Friedenstein, A., Piatetzky-Shapiro, I., und Petrakova, K. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3):381–390.
- Fu, C., Bechberger, J., Ozog, M., Perbal, B., und Naus, C. (2004). Ccn3 (nov) interacts with connexin43 in c6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem*, 279(35):36943–36950.

- Fuchs, S., Kornowski, R., Weisz, G., Satler, L., Smits, P., Okubagzi, P., Baffour, R., Aggarwal, A., Weissman, N., Cerqueira, M., Waksman, R., Serruys, P., Battler, A., Moses, J., Leon, M., und Epstein, S. (2006). Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol*, 97(6):823–829.
- Fukuda, K. und Yuasa, S. (2006). Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res*, 98(8):1002–1013.
- Furlani, D., Li, W., Pittermann, E., Klopsch, C., Wang, L., Knopp, A., Jungebluth, P., Thedinga, E., Havenstein, C., Westien, I., Ugurlucan, M., Li, R., Ma, N., und Steinhoff, G. (2009). A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. *Cell Transplant*, 18(3):319–331.
- Garbade, J., Schubert, A., Rastan, A., Lenz, D., Walther, T., Gummert, J., Dhein, S., und Mohr, F. (2005). Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 28(5):685–691.
- Gellhaus, A., Dong, X., Propson, S., Maass, K., Klein-Hitpass, L., Kibschull, M., Traub, O., Willecke, K., Perbal, B., Lye, S., und Winterhager, E. (2004). Connexin43 interacts with nov: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem*, 279(35):36931–36942.
- Go, M., Takenaka, C., und Ohgushi, H. (2008). Forced expression of sox2 or nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res*, 314(5):1147–1154.
- Gordon, S. (1975). Cell fusion and some subcellular properties of heterokaryons and hybrids. *J Cell Biol*, 67(2PT.1):257–280.
- Grauss, R., van, T. J., Steendijk, P., Winter, E., Pijnappels, D., Hogers, B., Gittenberger-De Groot, A., van der, G. R., van der, L. A., de Vries, A., Schalij, M., und Atsma, D. (2008). Forced myocardin expression enhances the therapeutic effect of human mesenchymal stem cells after transplantation in ischemic mouse hearts. *Stem Cells*, 26(4):1083–1093.
- Gronthos, S., Simmons, P., Graves, S., und Robey, P. (2001). Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone*, 28(2):174–181.
- Guccion, J. und Enzinger, F. (1972). Malignant giant cell tumor of soft parts. an analysis of 32 cases. *Cancer*, 29(6):1518–1529.
- Guillou, L., Coindre, J., Bonichon, F., Nguyen, B., Terrier, P., Collin, F., Vilain, M., Mandard, A., Le, Doussal, V., Leroux, A., Jacquemier, J., Duplay, H., Sastre-Garau, X., und Costa, J. (1997). Comparative study of the national cancer institute and french federation of cancer centers sarcoma group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*, 15(1):350–362.
- Hamamoto, H., Gorman, J.H., I., Ryan, L., Hinmon, R., Martens, T., Schuster, M., Plappert, T., Kiupel, M., St John-Sutton, M., Itescu, S., und Gorman, R. (2009). Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg*, 87(3):794–801.

- Hanna, E., Umhauer, S., Roshong, S., Piechocki, M., Fernstrom, M., Fanning, J., und Ruch, R. (1999). Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*, 20(7):1369–1373.
- Hatzistergos, K., Quevedo, H., Oskouei, B., Hu, Q., Feigenbaum, G., Margitich, I., Mazhari, R., Boyle, A., Zambrano, J., Rodriguez, J., Dulce, R., Pattany, P., Valdes, D., Revilla, C., Heldman, A., McNiece, I., und Hare, J. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 107(7):913–922.
- Holnthoner, W., Pillinger, M., Groger, M., Wolff, K., Ashton, A., Albanese, C., Neumeister, P., Pestell, R., und Petzelbauer, P. (2002). Fibroblast growth factor-2 induces lef/tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 277(48):45847–45853.
- Hong, D., Chen, H., Xue, Y., Li, D., Wan, X., Ge, R., und Li, J. (2009). Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of taz expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116(1-2):86–92.
- Huang, R., Fan, Y., Hossain, M., Peng, A., Zeng, Z., und Boynton, A. (1998). Reversion of the neoplastic phenotype of human glioblastoma cells by connexin 43 (cx43). *Cancer Res*, 58(22):5089–5096.
- Imanishi, Y., Saito, A., Komoda, H., Kitagawa-Sakakida, S., Miyagawa, S., Kondoh, H., Ichikawa, H., und Sawa, Y. (2008). Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*, 44(4):662–671.
- Ionta, M., Ferreira, R., Pfister, S., und hado Santelli, G. (2009). Exogenous cx43 expression decrease cell proliferation rate in rat hepatocarcinoma cells independently of functional gap junction. *Cancer Cell Int*, 9.
- Ito, A., Katoh, F., Kataoka, T., Okada, M., Tsubota, N., Asada, H., Yoshikawa, K., Mameda, S., Kitamura, Y., Yamasaki, H., und Nojima, H. (2000). A role for heterologous gap junctions between melanoma and endothelial cells in metastasis. *J Clin Invest*, 105(9):1189–1197.
- Javazon, E., Beggs, K., und Flake, A. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 32(5):414–425.
- Junqueira, L. und Caneiro, J. (1996). *Histologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 4 edition.
- Kagiwada, H., Yashiki, T., Ohshima, A., Tadokoro, M., Nagaya, N., und Ohgushi, H. (2008). Human mesenchymal stem cells as a stable source of vegf-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(4):184–189.
- Kajstura, J., Rota, M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafe, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., und Anversa, P. (2005). Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*, 96(1):127–137.
- Kalimi, G., Hampton, L., Trosko, J., Thorgeirsson, S., und Huggett, A. (1992). Homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in v-raf-, v-myc-, and v-raf/v-myc-transduced rat liver epithelial cell lines. *Mol Carcinog*, 5(4):301–310.



- Kanczuga-Koda, L., Koda, M., Sulkowski, S., Wincewicz, A., Zalewski, B., und Sulkowska, M. (2010). Gradual loss of functional gap junction within progression of colorectal cancer – a shift from membranous cx32 and cx43 expression to cytoplasmic pattern during colorectal carcinogenesis. *In Vivo*, 24(1):101–107.
- Karnoub, A., Dash, A., Vo, A., Sullivan, A., Brooks, M., Bell, G., Richardson, A., Polyak, K., Tubo, R., und Weinberg, R. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162):557–563.
- Katenkamp, D. und Katenkamp, K. (2009). Modern morphological diagnosis and current classification of soft tissue sarcomas. *Chirurg*, 80(3):186–193.
- Khakoo, A., Pati, S., Anderson, S., Reid, W., Elshal, M., Rovira, I., Nguyen, A., Malide, D., Combs, C., Hall, G., Zhang, J., Raffeld, M., Rogers, T., Stetler-Stevenson, W., Frank, J., Reitz, M., und Finkel, T. (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of kaposi's sarcoma. *J Exp Med*, 203(5):1235–1247.
- Kiefel, V. (2010). *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 4 edition.
- Kielty, C., Sherratt, M., und Shuttleworth, C. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci*, 115(Pt 14):2817–2828.
- Kim, J., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., Meyer, J., Hübner, K., Bernemann, C., Ortmeier, C., Zenke, M., Fleischmann, B., Zaehres, H., und Schöler, H. (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 136(3):411–419.
- King, T., Fukushima, L., Hieber, A., Shimabukuro, K., Sakr, W., und Bertram, J. (2000). Reduced levels of connexin43 in cervical dysplasia: inducible expression in a cervical carcinoma cell line decreases neoplastic potential with implications for tumor progression. *Carcinogenesis*, 21(6):1097–1109.
- Kopen, G., Prockop, D., und Phinney, D. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(19):10711–10716.
- Krutovskikh, V., Mazzoleni, G., Mironov, N., Omori, Y., Aguelon, A., Mesnil, M., Berger, F., Partensky, C., und Yamasaki, H. (1994). Altered homologous and heterologous gap-junctional intercellular communication in primary human liver tumors associated with aberrant protein localization but not gene mutation of connexin 32. *Int J Cancer*, 56(1):87–94.
- Kudo, M., Wang, Y., Wani, M., Xu, M., Ayub, A., und Ashraf, M. (2003). Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*, 35(9):1113–1119.
- Kuhn, N. und Tuan, R. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*, 222(2):268–277.
- Kumar, N. und Gilula, N. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3):381–388.

- Kurtova, A., Balakrishnan, K., Chen, R., Ding, W., Schnabl, S., Quiroga, M., Sivina, M., Wierda, W., Estrov, Z., Keating, M., Shehata, M., Jager, U., Gandhi, V., Kay, N., Plunkett, W., und Burger, J. (2009). Diverse marrow stromal cells protect cll cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood*, 114(20):4441–4450.
- Laugwitz, K., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L., Cai, C., Lu, M., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, J., Evans, S., und Chien, K. (2005). Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433(7026):647–653.
- Lee, K., Kuo, T., Whang-Peng, J., Chung, Y., Lin, C., Chou, S., Chen, J., Chen, Y., und Lee, O. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*, 40(6):1275–1284.
- Leobon, B., Garcin, I., Menasche, P., Vilquin, J., Audinat, E., und Charpak, S. (2003). Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(13):7808–7811.
- Leontyev, S., Schlegel, F., Spath, C., Schmiedel, R., Nichtitz, M., Boldt, A., Rubsamen, R., Salameh, A., Kostelka, M., Mohr, F., und Dhein, S. (2013). Transplantation of engineered heart tissue as a biological cardiac assist device for treatment of dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*, 15(1):23–35.
- Li, L. und Neaves, W. (2006). Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res*, 66(9):4553–4557.
- Lipinski, M., Biondi-Zoccai, G., Abbate, A., Khianey, R., Sheiban, I., Bartunek, J., Vanderheyden, M., Kim, H., Kang, H., Strauer, B., und Vetovec, G. (2007). Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, 50(18):1761–1767.
- Loewenstein, W. und Kanno, Y. (1966). Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells. *Nature*, 209(5029):1248–1249.
- Lunde, K., Solheim, S., Aakhus, S., Arnesen, H., Abdelnoor, M., Egeland, T., Endresen, K., Ilebakk, A., Mangschau, A., Fjeld, J., Smith, H., Taraldsrud, E., Grogard, H., Bjornerheim, R., Brekke, M., Muller, C., Hopp, E., Ragnarsson, A., Brinchmann, J., und Forfang, K. (2006). Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355(12):1199–1209.
- Ma, J., Guo, L., Fiene, S., Anson, B., Thomson, J., Kamp, T., Kolaja, K., Swanson, B., und January, C. (2011). High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(5):2006–2017.
- Maas, H. (2014). Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz.
- Mackay, A., Gomez, D., Cottam, D., Rees, R., Nason, A., und Thorgeirsson, U. (1993). Identification of the 72-kda (mmp-2) and 92-kda (mmp-9) gelatinase/type iv collagenase in preparations of laminin and matrigel. *Biotechniques*, 15(6):1048–1051.

- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., Sano, M., Takahashi, T., Hori, S., Abe, H., Hata, J., Umezawa, A., und Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103(5):697–705.
- Mastitskaya, S. und Denecke, B. (2009). Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes in vitro. *J Negat Results Biomed*, 8:8–11.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., und Komuro, I. (2004a). Adult cardiac sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 279(12):11384–11391.
- Matsuura, K., Wada, H., Nagai, T., Iijima, Y., Minamino, T., Sano, M., Akazawa, H., Molkenkin, J., Kasanuki, H., und Komuro, I. (2004b). Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol*, 167(2):351–363.
- Menasche, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J., Marolleau, J., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M., und Hagege, A. (2008). The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (magic) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 117(9):1189–1200.
- Menasche, P., Hagege, A., Vilquin, J., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., Bruneval, P., Benbunan, M., Marolleau, J., und Duboc, D. (2003). Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 41(7):1078–1083.
- Messina, E., De, A. L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, M., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., und Giacomello, A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 95(9):911–921.
- Min, J., Yang, Y., Sullivan, M., Ke, Q., Converso, K., Chen, Y., Morgan, J., und Xiao, Y. (2003). Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 125(2):361–369.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H., Molinolo, A., Fu, B., Patel, V., Seo, B., Sonoyama, W., Zheng, J., Baker, C., Chen, W., Ried, T., und Shi, S. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*, 24(4):1095–1103.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S., und Mori, H. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*, 12(4):459–465.
- Moennikes, O., Buchmann, A., Willecke, K., Traub, O., und Schwarz, M. (2000). Hepatocarcinogenesis in female mice with mosaic expression of connexin32. *Hepatology*, 32(3):501–506.
- Moorby, C. und Patel, M. (2001). Dual functions for connexins: Cx43 regulates growth independently of gap junction formation. *Exp Cell Res*, 271(2):238–248.

- Mulisch, M. und Welsch, U. (2010a). Übersichtsfärbungen. In Mulisch, M. und Welsch, U., editors, *Romeis Mikroskopische Technik*, volume 18, pages 214–215. Spektrum Akademischer Verlag.
- Mulisch, M. und Welsch, U. (2010b). Färbung von mikrofibrillen der elastischen fasern und oxytalanfasern. In Mulisch, M. und Welsch, U., editors, *Romeis Mikroskopische Technik*, volume 18, pages 223–223. Spektrum Akademischer Verlag.
- Muraglia, A., Cancedda, R., und Quarto, R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*, 113:1161–1166.
- Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H., Miyatake, K., und Kitamura, S. (2005). Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 112(8):1128–1135.
- Nichtitz, M. (2009). *Herstellung eines 3-dimensionalen Herzwebes und Untersuchung des Gewebes auf äußere elektrische und mechanische Einflüsse*. PhD thesis, Herzzentrum Leipzig.
- Noiseux, N., Gnecci, M., Lopez-Illasaca, M., Zhang, L., Solomon, S., Deb, A., Dzau, V., und Pratt, R. (2006). Mesenchymal stem cells overexpressing akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*, 14(6):840–850.
- Obokata, H., Wakayama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M., Niwa, H., Yamato, M., und Vacanti, C. (2014). Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*, 505(7485):641–647.
- Ohlsson, L., Varas, L., Kjellman, C., Edvardsen, K., und Lindvall, M. (2003). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol*, 75(3):248–255.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M., und Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22(3):377–384.
- Oviedo-Orta, E. und Howard, E. W. (2004). Gap junctions and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta*, 1662(1–2):102–112.
- Oviedo-Orta, E., Hoy, T., und Evans, W. (2000). Intercellular communication in the immune system: differential expression of connexin40 and 43, and perturbation of gap junction channel functions in peripheral blood and tonsil human lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 99(4):578–590.
- Patel, S., Meyer, J., Greco, S., Corcoran, K., Bryan, M., und Rameshwar, P. (2010). Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory t cells: role of mesenchymal stem cell-derived tgf-beta. *J Immunol*, 184(10):5885–5894.
- Peichev, M., Naiyer, A., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W., Williams, M., Oz, M., Hicklin, D., Witte, L., Moore, M., und Rafii, S. (2000). Expression of vegfr-2 and ac133 by circulating human cd34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95(3):952–958.

- Peran, M., Marchal, J., Lopez, E., Jimenez-Navarro, M., Boulaiz, H., Rodriguez-Serrano, F., Carrillo, E., Sanchez-Espin, G., de, T. E., Tosh, D., und Aranega, A. (2010). Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytotherapy*, 12(3):332–337.
- Perbal, B. (2004). Ccn proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet*, 363(9402):62–64.
- Perin, E., Dohmann, H., Borojevic, R., Silva, S., Sousa, A., Mesquita, C., Rossi, M., Carvalho, A., Dutra, H., Dohmann, H., Silva, G., Belem, L., Vivacqua, R., Rangel, F., Esporcatte, R., Geng, Y., Vaughn, W., Assad, J., Mesquita, E., und Willerson, J. (2003). Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation*, 107(18):2294–2302.
- Perin, E., Silva, G., Assad, J., Vela, D., Buja, L., Sousa, A., Litovsky, S., Lin, J., Vaughn, W., Coulter, S., Fernandes, M., und Willerson, J. (2008). Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 44(3):486–495.
- Pevsner-Fischer, M., Levin, S., und Zipori, D. (2011). The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*, 7(3):560–568.
- Phinney, D., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., und Prockop, D. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, 75(3):424–436.
- Pilarski, L. und Jensen, G. (1992). Monoclonal circulating b cells in multiple myeloma. a continuously differentiating, possibly invasive, population as defined by expression of cd45 isoforms and adhesion molecules. *Hematol Oncol Clin North Am*, 6(2):297–322.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M., Simonetti, D., Craig, S., und Marshak, D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411):143–147.
- Pochampally, R., Neville, B., Schwarz, E., Li, M., und Prockop, D. (2004). Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(25):9282–9285.
- Prowse, K. und Greider, C. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(11):4818–4822.
- Qi, C., Ma, G., Liu, N., Shen, C., Chen, Z., Liu, X., Hu, Y., Zhang, X., Teng, G., Ju, S., Ma, M., und Tang, Y. (2008). Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells improves cardiac function in a swine myocardial infarction model. *Chin Med J (Engl)*, 121(6):544–550.
- Ramasamy, R., Lam, E., Soeiro, I., Tisato, V., Bonnet, D., und Dazzi, F. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*, 21(2):304–310.
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E., Bongso, A., und Sim, E. (2003). Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 75(3):775–779.

- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwlinka, G., Fritsch, P., Steinman, R., und Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*, 180(1):83–93.
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M., de la, F. R., Cigudosa, J., Lloyd, A., und Bernad, A. (2005). Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*, 65(8):3035–3039.
- Russell, K., Phinney, D., Lacey, M., Barrilleaux, B., Meyertholen, K., und O’Connor, K. (2010). In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells*, 28(4):788–798.
- Saric, T., Frenzel, L., und Hescheler, J. (2008). Immunological barriers to embryonic stem cell-derived therapies. *Stem Cell Rev*, 188(1–2):78–90.
- Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D., Hamm, C., Suselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., und Zeiher, A. (2006). Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355(12):1210–1221.
- Schenke-Layland, K., Rhodes, K., Angelis, E., Butylkova, Y., Heydarkhan-Hagvall, S., Gekas, C., Zhang, R., Goldhaber, J., Mikkola, H., Plath, K., und MacLellan, W. (2008). Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells*, 26(6):1537–1546.
- Schiebler, T. und Korf, H.-W. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. Steinkopff Verlag, 10 edition.
- Schlegel, F., Dhein, S., Akhavuz, Ö., Mohr, F., und Dohmen, P. (2013). A new possibility to reprogram bone marrow stem cells into endothelial like cells.
- Shake, J., Gruber, P., Baumgartner, W., Senechal, G., Meyers, J., Redmond, J., Pittenger, M., und Martin, B. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*, 73(6):1919–1925.
- Shore, L., McLean, P., Gilmour, S., Hodgins, M., und Finbow, M. (2001). Polyamines regulate gap junction communication in connexin 43-expressing cells. *Biochem J*, 357(2):489–495.
- Silva, G., Litovsky, S., Assad, J., Sousa, A., Martin, B., Vela, D., Coulter, S., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W., Branco, R., Oliveira, E., He, R., Geng, Y., Willerson, J., und Perin, E. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*, 111(2):150–156.
- Simmons, D., Satterthwaite, A., Tenen, D., und Seed, B. (1992). Molecular cloning of a cDNA encoding cd34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol*, 148(1):267–271.
- Skalak, R. und Fox, C. (1988). Tissue engineering. In *Tissue Engineering*, UCLA symposia on molecular and cellular biology. Liss.
- Slobodianski, A. (2006). *Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten*. PhD thesis, Universität Hamburg, Hamburg.

- Solter, D. (2006). From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 7(4):319–327.
- Song, L. und Tuan, R. (2004). Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*, 18(9):980–982.
- Soroceanu, L., Manning, T.J., J., und Sontheimer, H. (2001). Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*, 33(2):107–117.
- Spath, C., Schlegel, F., Leontyev, S., Mohr, F., und Dhein, S. (2013). Inverse relationship between tumor proliferation markers and connexin expression in a malignant cardiac tumor originating from mesenchymal stem cell engineered tissue in a rat in vivo model. *Front Pharmacol*, 4.
- Strauer, B., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R., Kogler, G., und Wernet, P. (2002). Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*, 106(15):1913–1918.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663–676.
- Tang, J., Xie, Q., Pan, G., Wang, J., und Wang, M. (2006). Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30(2):353–361.
- Temme, A., Buchmann, A., Gabriel, H., Nelles, E., Schwarz, M., und Willecke, K. (1997). High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol*, 7(9):713–716.
- Tian, K., Yang, S., Ren, Q., Han, Z., Lu, S., Ma, F., Zhang, L., und Han, Z. (2010). p38 mapk contributes to the growth inhibition of leukemic tumor cells mediated by human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 26(6):799–808.
- Tian, L., Yue, W., Zhu, F., Li, S., und Li, W. (2011). Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*, 226(7):1860–1867.
- Tolar, J., Nauta, A., Osborn, M., Panoskaltsis, M. A., McElmurry, R., Bell, S., Xia, L., Zhou, N., Riddle, M., Schroeder, T., Westendorf, J., McIvor, R., Hogendoorn, P., Szuhai, K., Oseth, L., Hirsch, B., Yant, S., Kay, M., Peister, A., Prockop, D., Fibbe, W., und Blazar, B. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25(2):371–379.
- Toma, C., Pittenger, M., Cahill, K., Byrne, B., und Kessler, P. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105(1):93–98.
- Towns, C. und Jones, D. (2004). Stem cells, embryos, and the environment: a context for both science and ethics. *J Med Ethics*, 30(4):410–413.
- Verfaillie, C., Pera, M., und Lansdorp, P. (2002). Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, pages 369–391.

- Vukicevic, S., Kleinman, H., Luyten, F., Roberts, A., Roche, N., und Reddi, A. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res*, 202(1):1–8.
- Wan, X., Liu, C., Li, M., Hong, D., Li, D., Chen, H., und Li, J. (2008). Staphylococcal enterotoxin c injection in combination with ascorbic acid promotes the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 373(4):488–492.
- Wang, T., Xu, Z., Jiang, W., und Ma, A. (2006). Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol*, 109(1):74–81.
- Wang, X., Zhang, Z., und Yao, C. (2010). Survivin is upregulated in myeloma cell lines cocultured with mesenchymal stem cells. *Leuk Res*, 34(10):1325–1329.
- Wang, Y., Huso, D., Harrington, J., Kellner, J., Jeong, D., Turney, J., und McNiece, I. (2005). Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human bm mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*, 7(6):509–519.
- Wei, Z., Chen, N., Guo, H., Wang, X., Xu, F., Ren, Q., Lu, S., Liu, B., Zhang, L., und Zhao, H. (2009). Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived k562 cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 28.
- Welsch, U. (2010). *Zytologie und Histologie*. Springer Berlin.
- Wieczorek, G., Steinhoff, C., Schulz, R., Scheller, M., Vingron, M., Ropers, H., und Nuber, U. (2003). Gene expression profile of mouse bone marrow stromal cells determined by cDNA microarray analysis. *Cell Tissue Res*, 311(2):227–237.
- Wollert, K., Meyer, G., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., und Drexler, H. (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the boost randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 364(9429):141–148.
- Yamasaki, H., Mesnil, M., Omori, Y., Mironov, N., und Krutovskikh, V. (1995). Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res*, 333(1–2):181–188.
- Yoon, J., Shim, W., Ro, Y., und Lim, D. (2005). Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol*, 84(11):715–721.
- Yu, J., Vodyanik, M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., und Thomson, J. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858):1917–1920.
- Zhang, J., Wilson, G., Soerens, A., Koonce, C., Yu, J., Palecek, S., Thomson, J., und Kamp, T. (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 104(4):30–41.
- Zhang, L. und Chan, C. (2010). Isolation and enrichment of rat mesenchymal stem cells (mscs) and separation of single-colony derived mscs. *J Vis Exp*, (37).



- Zhang, Y., Kaneda, M., und Morita, I. (2003a). The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43. *J Biol Chem*, 278(45):44852–44856.
- Zhang, Y., Morita, I., Ikeda, M., Ma, K., und Murota, S. (2001). Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma u2os cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene*, 20(31):4138–4149.
- Zhang, Y., Nakayama, K., Nakayama, K., und Morita, I. (2003b). A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of s-phase kinase-associated protein (skp 2). *Cancer Res*, 63(7):1623–1630.
- Zhou, Y., Bosch-Marce, M., Okuyama, H., Krishnamachary, B., Kimura, H., Zhang, L., Huso, D., und Semenza, G. (2006). Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res*, 66(22):10849–10854.
- Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C., und Chen, Y. (2006). Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*, 80(3):267–274.
- Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., Li, J., Yan, X., Liu, Y., Shao, C., und Zhao, R. (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting dkk-1. *Leukemia*, 23(5):925–933.
- Zimmermann, W., Didie, M., Doker, S., Melnychenko, I., Naito, H., Rogge, C., Tiburcy, M., und Eschenhagen, T. (2006a). Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res*, 71(3):419–429.
- Zimmermann, W., Didie, M., Wasmeier, G., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, W., Weyand, M., und Eschenhagen, T. (2002). Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation*, 106(12):151–157.
- Zimmermann, W., Fink, C., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., und Eschenhagen, T. (2000). Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng*, 68(1):106–114.
- Zimmermann, W., Melnychenko, I., Wasmeier, G., Didie, M., Naito, H., Nixdorff, U., Hess, A., Budinsky, L., Brune, K., Michaelis, B., Dhein, S., Schwoerer, A., Ehmke, H., und Eschenhagen, T. (2006b). Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med*, 12(4):452–458.
- Zuo, G., Kohls, C., He, B., Chen, L., Zhang, W., Shi, Q., Zhang, B., Kang, Q., Luo, J., Luo, X., Wagner, E., Kim, S., Restegar, F., Haydon, R., Deng, Z., Luu, H., He, T., und Luo, Q. (2010). The ccn proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis. *Histol Histopathol*, 25(6):795–806.

# Anlagen

Abhängige Parameter	Faktoren		
	p-Wert Zellsorte	p-Wert in vitro / in vivo	p-Wert Interaktion
Kollagenanteil	<0,001 *	<0,001 *	<0,001 *
Myozytenanteil	<0,001 *	0,507	0,526
Anteil an elastischen Fasern	<0,001 *	<0,001 *	<0,001 *
Gefäßfläche / Gesamtfläche	0,43	<0,001 *	0,52
Gefäßanzahl / 1 mm <sup>2</sup>	0,78	<0,001 *	0,005 *
Mittlerer Gefäßperimeter	0,87	<0,001 *	0,94
Gefäßperimeter klein	0,088	0,025 *	0,36
Gefäßperimeter mittel	0,13	0,879	0,412
Gefäßperimeter groß	0,62	<0,001 *	0,676
Mittlere Wanddicke	0,039 *	<0,001 *	0,943

Tabelle 6.1: Statistischer Vergleich: EHT versus MSC-ET. Durchgeführt mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse (\*  $p < 0,05$ ).

Abhängige Parameter	Faktoren		
	p-Wert Zellsorte	p-Wert in vitro / in vivo	p-Wert Interaktion
Kollagenanteil	0,009 *	<0,001 *	0,551
Myozytenanteil	0,306	0,956	0,213
Anteil an elastischen Fasern	<0,001 *	<0,001 *	<0,001 *
Gefäßfläche / Gesamtfläche	0,186	<0,001 *	0,338
Gefäßanzahl / 1 mm <sup>2</sup>	0,701	<0,001 *	0,002 *
Mittlerer Gefäßperimeter	0,917	0,002 *	0,763
Gefäßperimeter klein	0,287	0,024 *	0,587
Gefäßperimeter mittel	0,354	0,94	0,737
Gefäßperimeter groß	0,399	<0,001 *	0,368
Mittlere Wanddicke	0,008 *	<0,001 *	0,737

Tabelle 6.2: Statistischer Vergleich: sMSC-ET versus cMSC-ET. Durchgeführt mittels mehrfaktorieller Varianzanalyse (\*  $p < 0,05$ ).

Parameter	Kriterium
Tumordifferenzierung	
Score = 1	histologisch dem normalen, adulten, mesenchymalen Gewebe sehr ähnlich
Score = 2	Sarkom eines definierten histologischen Subtyps wie z. B. Malignes Fibröses Histiozytom (MFH)
Score = 3	Sarkom eines unbestimmten Typs (embryonales und undifferenziertes Sarkom)
Anzahl der Mitosen	
Score = 1	0-9/10 HPF
Score = 2	10-19/10 HPF
Score = 3	$\geq 20/10$ HPF
Tumornekrose	
Score = 0	keine Nekrose
Score = 1	$\leq 50\%$ Nekrose
Score = 2	$> 50\%$ Nekrose
Histologischer Grad	
Grad = 1	Gesamtscore 2 oder 3
Grad = 2	Gesamtscore 4 oder 5
Grad = 3	Gesamtscore 6, 7 oder 8

Tabelle 6.3: FNCLCC-System.

# Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in dieser Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Cathleen Spath  
Geburtsdaten: 06.12.1985 in Bad Frankenhausen  
Anschrift: Augartenstraße 2, 68165 Mannheim  
Telefon: 0176 56700475  
E-Mail: cathleen\_spath@web.de  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

## Berufliche Tätigkeit

seit 01/2013 Assistenzärztin für Urologie am Vincentius-Krankenhaus Landau /  
St.-Vincentius-Krankenhaus Speyer unter Prof. Dr. med. Haupt

## Forschungsarbeit

seit 01/2009 Dissertation am Herzzentrum Leipzig unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. Stefan Dhein  
04/2009 – 03/2011 wissenschaftliche Hilfskraft am Translationszentrum für  
Regenerative Medizin Leipzig der Universität Leipzig (TRM),  
Thema: „Translating engineered heart tissue technology into clinics“  
(Fördernummer 0313909)

## Studium

10/2005 – 05/2012 Studium Humanmedizin an der Universität Leipzig (Note 2,33)  
Praktisches Jahr  
10/2011 – 01/2012 Innere Medizin: Kantonsspital Luzern, CH, Prof. Dr. med. Briner  
06/2011 – 10/2011 Urologie: Vogtlandklinikum Plauen, PD Dr. med. Werner  
04/2011 – 06/2011 Chirurgie: Vogtlandklinikum Plauen, Dr. med. Meyer  
02/2011 – 04/2011 Chirurgie: Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika, Prof. Warren

## Schule

06/2004 Abitur am Hoffmann-von-Fallersleben-Gymnasium Weimar  
(Note 1,5)

## Sonstiges

10/2004 – 02/2005 Pflegepraktikum am Sophien- und Hufelandklinikum Weimar  
04/2005 – 09/2005 Auslandsaufenthalt in Paris, Beschäftigung als Au-pair

# Publikationen

## Artikel in Zeitschriften

**Spath, C.\***, Schlegel, F.\*, Leontyev, S., Mohr, F. W., & Dhein, S. (2013). Inverse relationship between tumor proliferation markers and connexin expression in a malignant cardiac tumor originating from mesenchymal stem cell engineered tissue in a rat in vivo model. *Frontiers in pharmacology*, 4. (\* contributed equally)

Leontyev, S.\*, Schlegel, F.\*, **Spath, C.**, Schmiedel, R., Nichtitz, M., Boldt, A., Rübsamen, R., Salameh, A., Kostelka, M., Mohr, F.W., & Dhein, S. (2013). Transplantation of engineered heart tissue as a biological cardiac assist device for treatment of dilated cardiomyopathy. *European journal of heart failure*, 15(1):23-35. (\* contributed equally)

## Abstracts / Postervorstellungen

**Spath, C.**, Schlegel, F., Nichtitz, M., Schmiedel, R., Leontyev, S., Dhein, S. & Mohr, F. W. (2012). Case of malignant transformation of mesenchymal stem cell engineered tissue in a rat heart in vivo model. *JSRM*, 8(2):P-46.

Schlegel F., Leontiev S., **Spath, C.**, Nichtitz, M., Schmiedel, R., Kostelka, M., Mohr, F. W. & Dhein, S. (2009). Charakterisation of engineered heart tissue. Proc. *World conference on Regenerative Medicine 2009*, 4(6):276.

Schlegel F., Leontiev S., **Spath, C.**, Nichtitz, M., Schmiedel, R., Kostelka, M. Mohr, F.W. & Dhein, S. (2011). Engineered heart tissue implantation improved the cardiac function in dilative cardiomyopathy in vivo. *American Journal of Transplantation, Special Issue: American Transplant Congress*, volume 11, issue supplement s2, page 282.

## Abstracts / Vorträge

Leontjev, S., Schlegel, F., **Spath, C.**, Schmiedel, R., Dhein, S. & Mohr, F. W. (2010). Engineering a new therapy for dilated cardiomyopathy based of engineered heart tissue (EHT). *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 58(S 01), V196.

Leontjev, S., Schlegel, F., **Spath, C.**, Schmiedel, R., Dhein, S. & Mohr, F. W. (2010). Using of Engineered Heart Tissue (EHT) for treatment of dilative cardiomyopathy. *American Journal of Transplantation, Special Issue: American Transplant Congress*, volume 10, issue supplement s4, page 48, abstract number 33.

Schlegel, F., Leontjev, S., **Spath, C.**, Nichtitz, M., Schmiedel, R., Kostelka, M., Mohr, F.W. & Dhein, S. (2010). Integration of a new engineered heart tissue into rat hearts in vivo. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 58(S 01), V195.

Schlegel, F., Leontjev, S., **Spath, C.**, Nichtitz, M., Schmiedel, R., Kostelka, M., Rübsamen, R., Mohr, F.W. & Dhein, S. (2010). Processing of physiological function and vascularisation of an engineered heart tissue after implantation in rat heart in vivo. *Acta physiologica*, volume 198, supplement 677, p4, S-Sat-1-4.

Schlegel, F., Leontjev, S., **Spath, C.**, Nichtitz, M., Schmiedel, R., Kostelka, M., Rübsamen, R., Mohr, F.W. & Dhein, S. (2011). Improvement of cardiac function and restoration of  $\beta$ -adrenergic responsiveness in dilative cardiomyopathy by implantation of a novel cardiac assist device (engineered heart tissue) in a rat model. *Regenerative Medicine*, 6(6), supplement 2, OP-113.

Leontyev, S., Schlegel, F., **Spath, C.**, Schmiedel, R., Nichtitz, M., Salameh, A., Mohr, F.W. & Dhein, S. (2011). The use of engineered heart tissue in the treatment of dilated cardiomyopathy. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 59(S 01), V139.



# Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Stefan Dhein bedanken, dass er mir die Gelegenheit geboten hat, mich wissenschaftlich mit einem so vielseitigen und interessanten Thema auseinander setzen zu können. Durch die vielen Freiheiten hatte ich in besonderem Maße die Möglichkeit selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten. Prof. Dr. med. Stefan Dhein verfügt über ein umfassendes Fachwissen und darüberhinaus über die Fähigkeit Sachverhalte über seine Forschungsgebiete hinaus in Verbindung zu bringen und diese in kürzester Zeit unmissverständlich zu formulieren. Seine Arbeitsweise ist faszinierend und nachahmungswürdig. Mein Dank gilt ebenso Dr. med. Martin Nichtitz, der mich geduldig in die Thematik schrittweise eingewiesen hat und ohne den es dieses Projekt so nicht gegeben hätte. Des Weiteren bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Dr. rer. nat. Franziska Schlegel. Sie war mir in jeglicher Hinsicht eine großartige Unterstützung und hat mir mit ihrer positiven Einstellung durch die schlechten Phasen der experimentellen Arbeit geholfen. Sie ist zu einer sehr engen Freundin geworden. Weiterhin gilt mein Dank PD Dr. med. Sergey Leontjev, der für die Implantation der EHTs verantwortlich war sowie Dr. rer. nat. Maja Theresa Dieterlen, die mir bei der Durchführung der FACS-Analysen tatkräftig geholfen hat. Für die finanzielle Unterstützung im Zeitraum von April 2009 bis März 2011 sei dem Translationszentrum für regenerative Medizin gedankt. Ein weiterer Dank gilt Martin Trenkmann, der mich in der Endphase in der Textverarbeitung und Bilddarstellung unterstützt hat. Zuletzt möchte ich mich bei meiner wunderbaren Mutter herzlich bedanken, für ihren unnachgiebigen Beistand und ihre Nachsicht in schwierigen Phasen.